

Université de Montréal

# **Évaluation du remodelage des voies respiratoires centrales de chevaux asthmatiques légers/modérés**

par Amandine BESSONNAT

Département de sciences cliniques  
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire  
en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M. Sc.)  
en sciences vétérinaires option sciences cliniques

Août 2018

© Amandine BESSONNAT, 2018

## Résumé

L'asthme équin est l'une des causes les plus fréquentes de consultation en pratique équine. Il est caractérisé par une inflammation non septique des voies respiratoires inférieures de chevaux de tous âges. Bien qu'il soit généralement autolimitant, l'asthme équin léger/modéré progressera jusqu'à la forme sévère chez environ 15% des chevaux ; un stade incurable associé à de la détresse respiratoire au repos. Le remodelage bronchique des voies respiratoires centrales de cette forme sévère est bien décrit dans la littérature. Il affecte toutes les structures et il est corrélé avec l'obstruction des voies respiratoires des chevaux affectés. Considérant l'altération de la fonction respiratoire dans les formes légère/modérée et sévère et les modifications structurales observées dans les voies respiratoires centrales dans cette dernière forme, l'hypothèse de la présente étude est qu'il existe un remodelage des voies respiratoires centrales chez certains chevaux asthmatiques légers/modérés et que celui-ci contribue à la progression de la maladie.

Le remodelage des voies respiratoires centrales de 12 chevaux asthmatiques légers/modérés a été caractérisé à l'aide de méthodes histomorphométriques et comparé à celui de 10 chevaux contrôles. Nous avons également évalué la fiabilité d'un score semi-quantitatif rapide pour l'identification des altérations morphologiques des voies respiratoires centrales.

La méthode d'histomorphométrie et l'application du score semi-quantitatif ont permis de mettre en évidence une hyperplasie épithéliale, une augmentation de l'épaisseur de la matrice extracellulaire et une infiltration de cellules inflammatoires augmentée dans la lamina propria chez les chevaux asthmatiques légers/modérés par rapport aux chevaux contrôles. Deux phénotypes de chevaux asthmatiques légers/modérés ont été mis en évidence : des chevaux présentant une hyperplasie épithéliale, dont l'inflammation pulmonaire est principalement neutrophilique, et dont la fraction de collagène dans le muscle lisse est augmentée, et des chevaux ne présentant pas d'hyperplasie épithéliale dont l'inflammation est mastocytaire, et où la fraction de collagène dans le muscle lisse est semblable à celle retrouvée chez les chevaux contrôles.

Il s'agit de la première étude visant à évaluer le remodelage des voies respiratoires centrales des chevaux asthmatiques légers/modérés en le comparant à celui des chevaux contrôles.

**Mots-clés :** Chevaux, asthme équin léger/modéré, voies respiratoires centrales, remodelage, histomorphométrie, score semi-quantitatif.

## Abstract

Equine asthma is a common condition affecting horses of all ages. It is characterized by a lower airway non-septic inflammation. Although it is transient in most of the horses, asthma progress to its severe form in 15% of them. This last state is incurable and associated with periods of respiratory distress at rest. Remodeling of the lower airways is present in severe asthma. The alterations affect all airway components and correlate with the degree of airway obstruction of affected horses. Considering the lung function impairments in mild/moderate asthmatic horses, we postulated that a central airway remodeling is present and contributes to the disease progression.

The structural changes affecting the central airways of 12 mild/moderate asthmatic horses and 10 aged-matched controls were studied using endobronchial biopsies and histomorphometric methods. The reliability of a fast-semi-quantitative score to identify morphological alterations of central airway was also evaluated.

The histomorphometric method and the semi-quantitative scores permitted to identify the presence of epithelial hyperplasia, extracellular matrix thickened, and cellular infiltration in the lamina propria in asthmatic horses when compared to control horses. Two phenotypes of asthmatic horses could be defined: horses with epithelial hyperplasia associated to neutrophilic airway inflammation and with fibrosis of the muscular layer; and horses without epithelial hyperplasia with mast cell airway inflammation and normal muscle layer collagen deposition.

It is the first study demonstrating the presence of central airway remodeling in mild/moderate asthmatic horses.

**Keywords:** Horses, mild/moderate equine asthma, central airway, remodeling, histomorphometry, semi-quantitative score.

# Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures .....	ix
Liste des sigles .....	xii
Remerciements.....	xiv
Introduction.....	1
Revue de littérature .....	2
1. Les voies respiratoires inférieures .....	2
1.1. Anatomie.....	2
1.2. Histologie.....	3
1.3. Physiologie.....	5
2. L'Asthme équin .....	6
2.1. Asthme équin sévère.....	7
2.2. Asthme équin léger/modéré .....	8
2.3. Traitements .....	9
2.4. Inflammation.....	13
2.5. Hypersensibilité des voies respiratoires.....	14
2.6. Remodelage tissulaire bronchique .....	14
2.6.1. Voies respiratoires centrales .....	15
2.6.2. Voies respiratoires périphériques.....	16
2.6.3. Réversibilité du remodelage bronchique .....	18
3. Méthodes diagnostiques.....	19
3.1. Cytologie : Lavage bronchoalvéolaire .....	19

3.2.	Histologie .....	20
3.2.1.	Score de qualité histologique de biopsies endobronchiques .....	23
3.2.2.	Histomorphométrie .....	25
3.2.3.	Score histologique semi-quantitatif de biopsies endobronchiques .....	26
3.3.	Imagerie .....	28
3.4.	Fonction respiratoire .....	28
3.4.1.	La mécanique respiratoire standard .....	29
3.4.2.	La mécanique par oscillométrie .....	29
3.4.3.	Autres méthodes.....	30
	Hypothèse et Objectifs.....	32
	Matériel et Méthodes .....	33
1.	Protocole expérimental .....	33
1.1.	Critères d'inclusion.....	34
1.2.	Critères d'exclusion .....	35
2.	Colorations.....	35
3.	Score de qualité histologique .....	35
4.	Histomorphométrie .....	36
4.1.	NewCAST.....	36
4.2.	ImageJ .....	39
5.	Score histologique semi-quantitatif .....	41
6.	Statistiques .....	42
	Résultats.....	44
1.	Chevaux .....	44
2.	Histomorphométrie .....	47
3.	Score histologique semi-quantitatif .....	65
4.	Associations entre les mesures histomorphométriques et le score histologique semi-quantitatif .....	72

Discussion générale .....	81
Conclusion et perspectives.....	90
Bibliographie.....	91
Annexes.....	i
1. Évaluation des résultats statistiques associés au retrait des 2 chevaux contrôles présentant une inflammation mastocytaire > 2 % : .....	i
2. Coloration MOVAT .....	iii
2.1. Protocole de préparation des colorants pour coloration MOVAT (Selma Ben Hamouda).....	iii
2.2. Protocole de coloration MOVAT (Selma Ben Hamouda).....	vi

## Liste des tableaux

Tableau I.	Tableau récapitulatif des différences histomorphométriques entre les groupes	63
Tableau II.	Tableau récapitulatif des corrélations entre les différents critères évalués.....	64
Tableau III.	Tableau récapitulatif des différences entre les groupes pour les critères individuels du score semi-quantitatif.....	71
Tableau IV.	Tableau récapitulatif des corrélations et associations entre les mesures histomorphométriques ou le score semi-quantitatif et le score histologique semi-quantitatif..	80
Tableau V.	Tableau récapitulatif de l'effet du retrait des deux chevaux asthmatiques avec une inflammation mastocytaire pulmonaire > 2 %..	ii



# Liste des figures

Figure 1.	Histologie d'une bronche d'un cheval sain.....	5
Figure 2.	Procédure : Site de prélèvement et prélèvement d'une biopsie endobronchique par endoscopie. ....	21
Figure 3.	Biopsie endobronchique, coloration pentachrome MOVAT .....	23
Figure 4.	Score de qualité histologique de biopsies endobronchiques.....	24
Figure 5.	Score histologique semi-quantitatif de biopsies endobronchiques .....	27
Figure 6.	Score d'évaluation de l'accumulation de mucus trachéal.....	34
Figure 7.	Évaluation de l'aire totale de la biopsie.....	37
Figure 8.	Évaluation de l'aire du muscle lisse dans une fraction de la biopsie.....	38
Figure 9.	Évaluation de la fraction de matrice extracellulaire dans le muscle lisse dans une fraction de la biopsie.....	39
Figure 10.	Mesure de la distance entre la membrane basale et le muscle lisse bronchique.....	40
Figure 11.	Mesure de l'aire de l'épithélium corrigée par la longueur de la membrane basale.....	41
Figure 12.	Répartition des âges des chevaux en fonction de statut contrôle et asthmatique.....	45
Figure 13.	Profil inflammatoire des chevaux en fonction du statut contrôle et asthmatique.....	46
Figure 14.	Score de mucus trachéal en fonction du statut contrôle et asthmatique .....	47
Figure 15.	Évaluation de l'aire totale des biopsies en fonction du statut contrôle et asthmatique.....	48
Figure 16.	Évaluation de l'aire de la matrice extracellulaire, de l'épithélium et du muscle lisse bronchique en fonction du statut contrôle et asthmatique.. ....	49
Figure 17.	Évaluation de la distance entre la membrane basale et le muscle lisse bronchique en fonction du statut contrôle et asthmatique .....	50

Figure 18.	Évaluation de la corrélation entre la fraction de matrice extracellulaire et la distance membrane basale-muscle lisse bronchique chez les chevaux contrôles et les chevaux asthmatiques.....	51
Figure 19.	Évaluation de la fraction de matrice extracellulaire dans la biopsie en fonction du statut contrôle et asthmatique.....	52
Figure 20.	Évaluation de la fraction de fibres élastiques dans la matrice extracellulaire en fonction du statut contrôle et asthmatique .....	52
Figure 21.	Évaluation de la corrélation entre la fraction de fibres élastiques dans la matrice extracellulaire et l'âge des chevaux contrôles et des chevaux asthmatiques .....	53
Figure 22.	Évaluation de la fraction de l'épithélium dans la biopsie en fonction du statut contrôle et asthmatique .....	54
Figure 23.	Aire de l'épithélium corrigée par la longueur de la membrane basale en fonction du statut contrôle et asthmatique.....	55
Figure 24.	Évaluation de la corrélation entre la neutrophilie pulmonaire et l'aire de l'épithélium corrigée par la longueur de la membrane basale chez les chevaux contrôles et les chevaux asthmatiques. ....	56
Figure 25.	Évaluation de la fraction de cellules caliciformes dans l'épithélium en fonction du statut contrôle et asthmatique.....	57
Figure 26.	Évaluation de la fraction de muscle lisse dans la biopsie en fonction du statut contrôle et asthmatique .....	58
Figure 27.	Répartition des fractions de tissus dans la biopsie endobronchique chez les chevaux contrôles et asthmatiques.....	58
Figure 28.	Évaluation de la fraction de matrice extracellulaire dans le muscle lisse en fonction du statut contrôle et asthmatique .....	59
Figure 29.	Évaluation de la corrélation entre la neutrophilie pulmonaire et la fraction de matrice extracellulaire dans le muscle lisse chez les chevaux contrôles et les chevaux asthmatiques.....	60
Figure 30.	Évaluation de l'épaisseur de la membrane basale en fonction du statut contrôle et asthmatique. ....	61

Figure 31.	Évaluation de la corrélation entre l'inflammation mastocytaire pulmonaire et la fraction de matrice extracellulaire dans le muscle lisse chez les chevaux contrôles et les chevaux asthmatiques.....	62
Figure 32.	Score semi-quantitatif total en fonction du statut contrôle et asthmatique.....	66
Figure 33.	Évaluation de la corrélation entre la neutrophilie pulmonaire et le score semi-quantitatif total chez les chevaux contrôles et les chevaux asthmatiques.....	67
Figure 34.	Évaluation de la corrélation entre la neutrophilie pulmonaire et le score d'hyperplasie épithéliale chez les chevaux contrôles et les chevaux asthmatiques.....	67
Figure 35.	Score semi-quantitatif : Infiltration de cellules inflammatoires dans la sous-muqueuse en fonction du statut contrôle et asthmatique.....	68
Figure 36.	Score semi-quantitatif : Hyperplasie épithéliale en fonction du statut contrôle et asthmatique.....	69
Figure 37.	Nouveau score semi-quantitatif en fonction du statut contrôle et asthmatique.	70
Figure 38.	Évaluation de l'association entre l'aire de l'épithélium corrigée par la longueur de la membrane basale et le score d'hyperplasie épithéliale chez les chevaux contrôles et les chevaux asthmatiques .....	73
Figure 39.	Évaluation de l'association entre la fibrose musculaire lisse et le score d'hyperplasie épithéliale chez les chevaux contrôles et les chevaux asthmatiques.....	74
Figure 40.	Répartition de la matrice extracellulaire dans le muscle lisse chez les chevaux asthmatiques en fonction du score d'hyperplasie épithéliale.....	74
Figure 41.	Évaluation de la fraction de fibrose musculaire lisse en fonction du statut contrôle et asthmatique avec une hyperplasie épithéliale .....	75
Figure 42.	Évaluation de la corrélation entre la fraction de matrice extracellulaire dans le muscle lisse et l'aire de l'épithélium corrigée par la longueur de la membrane basale chez les chevaux contrôles et les chevaux asthmatiques.....	76
Figure 43.	Évaluation de l'association entre la fraction de cellules caliciformes dans l'épithélium et le score d'hyperplasie des cellules caliciformes chez les chevaux contrôles et les chevaux asthmatiques. ....	77
Figure 44.	Évaluation de l'association entre l'épaisseur de la membrane basale et le score de membrane basale chez les chevaux contrôles et les chevaux asthmatiques.....	78

## Liste des sigles

BTRE : Biobanque de Tissus Respiratoires Équins

COPD : Chronic Obstructive Pulmonary Disease

EBUS : Échographie endobronchique

E<sub>L</sub> : Élastance pulmonaire

FOT : Technique d'Oscillation Forcée

H&E : Hématoxyline et Éosine

HEPS : Hématoxyline Éosine Phloxine Safran

HPS : Hématoxyline Phloxine Safran

IAD : Inflammatory Airway Disease

LBA : Lavage bronchoalvéolaire

MEC : Matrice xtracellulaire

ML : Muscle Lisse

MYOCD gene : Gène codant pour la myocardine

PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen

ΔP<sub>L</sub> : Pression transpulmonaire

RAO : Recurent Airway Obstruction

R<sub>L</sub> : Résistance pulmonaire

SRF : Serum Response Factor

TUNEL+ : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling

*« L'ennemi de la connaissance n'est pas  
l'ignorance, c'est l'illusion de la connaissance. »  
Stephen Hawking*

## Remerciements

Tout premièrement je tiens à remercier Dr Jean-Pierre Lavoie, pour m’avoir encadré au cours de mon internat et par la suite durant ma maîtrise. Bien que la médecine ne semblât pas ma discipline de prédilection il y a 2 ans, j’ai pris un certain plaisir à travailler sur les différents projets de recherche qui m’ont été proposés qu’ils soient cliniques ou non. J’ai également eu la chance de pouvoir réaliser d’autres projets de recherche parallèles, principalement en ophtalmologie, qui m’a permis de me rapprocher de ce domaine et d’en faire le mien pour les 3 prochaines années, et pour les quelques décennies suivantes, je l’espère. Dr Lavoie a su me faire évoluer, repousser un peu plus mes limites et m’a offert l’opportunité de présenter mes résultats lors de différents congrès parfois internationaux. Toujours à l’écoute et d’une patience inégalable, Dr Lavoie a toujours les mots (ou une boîte de mouchoirs), et la porte de son bureau nous est toujours ouverte.

Je tiens également à remercier Dr Hélié et Dre Grimes, pour leur contribution scientifique dans la réalisation de cette étude.

J’aimerai également remercier tous les membres du laboratoire, Khristine pour ton aide indispensable (à deux on n’est pas de trop !!) dans toutes nos manipulations, Sophie pour ton aide également dans nos projets annexes, pour ta rigueur et ton soutien moral lors de nos séances de gym, Selma pour ton aide et assistance dans cette fameuse éternelle coloration MOVAT, Roxane pour ton calme et ton organisation, Amandine pour ton sourire et ta bonne humeur (cela aurait été un plaisir de travailler un peu plus avec toi ...), Sheila pour nous avoir prouvé qu’on peut devenir bilingue en 6 mois.

Je remercie également mes parents, mon frère, le reste de ma famille qui me soutiennent dans chaque étape que j’entreprends (même si parfois je les perds un peu dans mon parcours). Leur éloignement n’est pas évident tous les jours, mais ils sont toujours présents.

Je remercie mon Anthony, pour son soutien moral et culinaire et également pour me suivre depuis toutes ces années dans mes études, mon travail, ma passion.

Pour finir, j’aimerais remercier Dr Jean et Dr Hélié d’avoir accepté d’être membres de mon jury de maîtrise. J’espère que la lecture de ce mémoire vous intéressera.

## Introduction

L'asthme équin léger/modéré est l'une des causes les plus fréquentes de consultation en pratique équine et c'est la deuxième cause d'intolérance à l'exercice chez les chevaux de haute performance. Il est caractérisé par la présence d'une inflammation non septique des voies respiratoires inférieures de chevaux de tous âges. Les signes cliniques associés sont variables, pouvant même se limiter à de l'intolérance à l'exercice dans sa forme la plus légère, ce qui rend son diagnostic difficile, et explique le sous-diagnostic de la maladie. Cette condition est transitoire chez la majorité des chevaux, mais peut également évoluer sous une forme sévère et incurable chez 15% des chevaux.

À l'heure actuelle, l'analyse cytologique des sécrétions bronchiques et alvéolaires obtenues par lavage bronchoalvéolaire (LBA) demeure la méthode diagnostique de référence de l'asthme équin dans des conditions de champ. En revanche, d'autres techniques évaluant la fonction respiratoire telles que la mécanique respiratoire standard, la mécanique par oscillométrie, la mesure de l'expiration forcée et l'évaluation de l'hyperréactivité bronchique sont utilisées en recherche.

Le remodelage des voies respiratoires centrales et périphériques est décrit chez les chevaux asthmatiques sévères. Les changements histologiques, lors d'exacerbation sont corrélés avec l'obstruction des voies respiratoires et contribuent à l'apparition de signes cliniques respiratoires au repos. Chez ces chevaux, la réponse thérapeutique ainsi que son effet sur le remodelage bronchique sont également étudiés. Les signes cliniques, l'obstruction et la neutrophilie pulmonaires sont généralement réversibles. En revanche, le remodelage bronchique ne n'est que partiellement.

Le remodelage des voies respiratoires centrales et périphériques des chevaux asthmatiques légers/modérés n'a pas encore été étudié. Cependant, considérant l'altération de la fonction respiratoire de ces chevaux et la progression de certains d'entre eux vers la forme sévère de la maladie, nous avons émis l'hypothèse qu'il existe un remodelage des voies respiratoires centrales et que celui-ci contribue à la progression de la maladie.

# **Revue de littérature**

## **1. Les voies respiratoires inférieures**

L'appareil respiratoire est composé des voies respiratoires supérieures et inférieures, ces dernières sont contenues dans la cage thoracique. L'appareil respiratoire supérieur est composé des cavités nasales où l'air est réchauffé et humidifié, du pharynx, du larynx et de la trachée extra-thoracique. L'air est conduit des voies respiratoires supérieures aux voies respiratoires inférieures par l'intermédiaire de bronches puis bronchioles, jusqu'aux alvéoles où ont lieu les échanges gazeux. Le rôle des voies respiratoires est d'apporter l'oxygène nécessaire au bon fonctionnement des tissus, mais également d'en éliminer le dioxyde de carbone produit par leur métabolisme. Les voies respiratoires ont également pour rôle d'éliminer les corps étrangers ou particules inhalées grâce à l'appareil mucociliaire, au réflexe de toux ou à d'autres mécanismes de défense.

### **1.1. Anatomie**

Les voies respiratoires inférieures se composent de la trachée, bifurquant dans le thorax au niveau de la carina en deux bronches principales, elles-mêmes se divisant en grosses bronches puis en bronches plus petites et en bronchioles pour aboutir aux alvéoles [1].

Chez le cheval, la trachée est formée d'anneaux cartilagineux incomplets dorsalement et aplatis dorso-ventralement [2-4]. Les extrémités des anneaux trachéaux sont reliées par les ligaments annulaires et plus centralement par le muscle lisse trachéal [4]. Sur sa face interne, la trachée est recouverte par une muqueuse composée d'un épithélium ciliée et de cellules à mucus [5]. Sa composition en anneaux cartilagineux lui confère une rigidité, mais également une souplesse permettant de suivre les mouvements du cou [4].

La trachée se divise, au niveau de la carina, en deux bronches principales droites et gauche qui conduisent l'air dans chaque poumon. Elles pénètrent respectivement dans le



poumon ipsilatéral puis se divisent en bronches lobaires puis segmentaires. L'arbre bronchique forme un support au parenchyme pulmonaire [1; 4].

Les bronches lobaires, dans les deux poumons, ventilent respectivement différents lobes pulmonaires : crânial, caudal et moyen. La bronche principale droite donne naissance à une 4<sup>e</sup> grosse bronche, celle ventilant le lobe accessoire. Les bronches sont définies comme une structure composée de cartilage et de diamètre supérieur à 2 mm [1]. Leur composition structurale est semblable à celle de la trachée; cependant, les anneaux cartilagineux de la trachée sont remplacés par des plaques cartilagineuses réunies par une membrane fibro-élastique. Ce cartilage s'amincit jusqu'à être remplacée par une membrane dans les bronchioles [4]. Chez les chevaux, contrairement aux chiens et chats, il n'y pas de bronchioles respiratoires [6; 7]. Les bronchioles non respiratoires se connectent aux canaux alvéolaires qui aboutissent aux sacs alvéolaires, constitués de plusieurs alvéoles où ont lieu les échanges gazeux avec les capillaires alvéolaires [1].

## **1.2. Histologie**

La composition histologique de la trachée et des bronches principales est semblable (figure 1). Elles sont recouvertes d'une membrane basale sur laquelle repose un épithélium cylindrique pseudostratifié composé de cellules basales, de cellules caliciformes et de cellules ciliées. Les cellules caliciformes produisent et libèrent à leur pôle apical le mucus dans la lumière des voies respiratoires. Les cellules ciliées, fixées entre elles par des jonctions serrées forment une structure imperméable. Leur pôle apical est composé de 200 à 250 cils [8], qui par leurs mouvements amples déplacent le mucus vers les voies respiratoires supérieures. Ces deux derniers types de cellules constituent l'escalateur muco-ciliaire.

Le tissu sous épithélial est divisé en deux structures :

- La lamina propria est située entre la membrane basale et le muscle lisse bronchique. Elle est composée de fibres de collagènes (fibres réticulées ; collagène de type III), de fibres élastiques, de fibres nerveuses et de vaisseaux bronchiques. Ces vaisseaux, issus de la

circulation systémique, permettent le réchauffement et l'humidification de l'air et participent à la réponse inflammatoire, sans intervenir dans les échanges gazeux [1; 9].

- La sous-muqueuse est composée du reste de la structure bronchique, soit des glandes à mucus dans la trachée, et moins fréquemment dans les bronches [4], du muscle lisse, du cartilage et d'autres tissus de support [8]. Le muscle lisse s'étend de la trachée jusqu'aux bronchioles terminales [4]. La fraction de muscle lisse bronchique dans les voies respiratoires périphériques ne varie pas avec l'âge chez les chevaux sains [10]. En revanche, les poulains présentent une fraction de bronche occupée par du muscle lisse plus importante comparée aux chevaux adultes, suggérant une diminution relative de la quantité de muscle lisse à l'âge adulte.

Chez les chevaux asthmatiques sévères en exacerbation, le muscle lisse bronchique est composé d'environ 20% de matrice extracellulaire, principalement constituée, respectivement dans les voies respiratoires centrales et périphériques, de fibres de collagène et de fibres élastiques [11].

Les bronchioles sont recouvertes d'un épithélium cubique simple. L'épithélium est composé de cellules « club », anciennement nommées cellules de Clara, et de cellules ciliées en nombre moins important par rapport aux bronches. Les cellules caliciformes ne sont présentes à ce niveau que chez les chevaux présentant une inflammation des voies respiratoires [1; 12].

L'épithélium cubique s'aplatit progressivement et se compose de pneumocytes de type I et de type II dans les alvéoles. Ces derniers libèrent de leur vésicule, le précurseur du surfactant pulmonaire, et sont capables de se différencier en pneumocytes de type I lors de lésions de l'alvéole [1]. La lamina propria et la sous-muqueuse diminuent progressivement d'épaisseur jusqu'aux alvéoles.

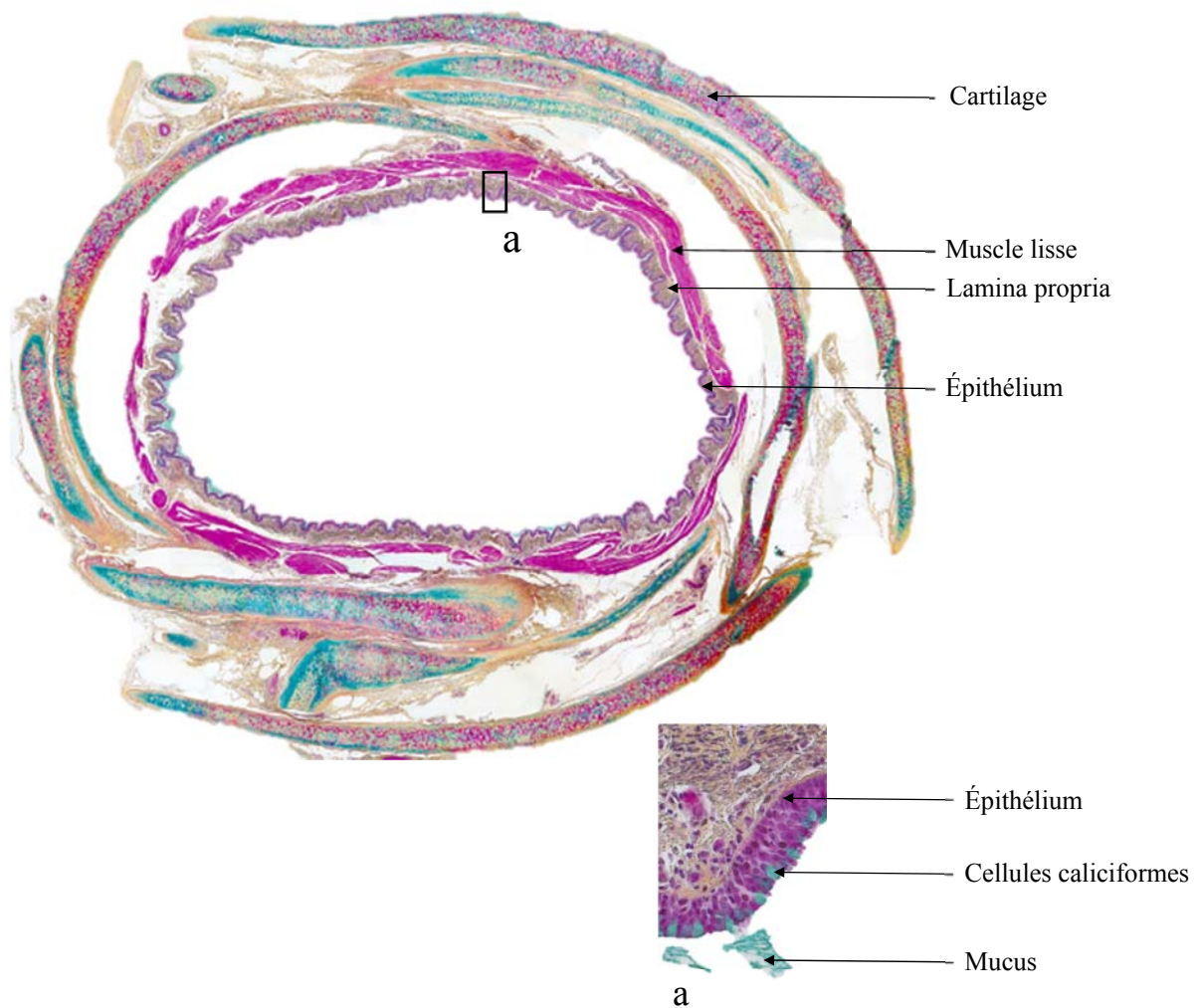


Figure 1. Histologie d'une bronche d'un cheval sain. Coloration MOVAT pentachrome, grossissement 100X.

### 1.3. Physiologie

Les bifurcations bronchiques des bronches principales jusqu'aux bronchioles entraînent une diminution du calibre des voies respiratoires ; cependant, l'augmentation du nombre de voies par ces dichotomies conduit à une augmentation de la capacité totale de l'arbre aérifère [4]. Les voies respiratoires permettent de conduire l'oxygène atmosphérique jusqu'aux alvéoles où il diffuse dans les capillaires sanguins.

Les cellules caliciformes produisent la mucine qui participe à la formation de la couche de mucus qui recouvre l'entièreté des voies respiratoires, à l'exception des bronchioles. Le mucus est biphasique et est composé d'une couche profonde aqueuse et d'une couche superficielle gélatineuse. Le rôle de cette dernière est d'emprisonner les particules inhalées qui seront transportées vers les voies respiratoires supérieures par les battements des cils des cellules ciliées, permis par la phase séreuse du mucus. Le mucus sera alors expulsé par la toux ou dégluti. Des changements de la composition du mucus lors de pathologies respiratoires chroniques telle que l'asthme sévère, altère l'élimination des particules emprisonnées, et résulte en une accumulation de mucus [13].

En raison de la modification de la composition cellulaire de l'épithélium et de l'absence de cellules ciliées dans les alvéoles pulmonaires, les particules de petites tailles déposées dans cette région sont éliminées par les macrophages alvéolaires transportés par le sang jusqu'aux alvéoles [13].

## **2. L'Asthme équin**

L'asthme équin, anciennement appelé RAO (Recurrent Airway Obstruction) ou souffle ("Heaves") et IAD (Inflammatory Airway Disease) apparaît depuis 2015 sous la nomenclature respective d'asthme équin sévère et asthme équin léger/modéré [14].

Quel que soit le grade de ce syndrome, il est caractérisé par une inflammation non septique des voies respiratoires inférieures. Les différentes formes se différencient principalement par leur présentation clinique, chacune d'elles sera détaillée par la suite [15]. Il s'agit d'un syndrome évolutif où les premiers signes cliniques observés sont souvent une baisse de performance à l'exercice qui évolue, chez les chevaux génétiquement susceptibles, vers une détresse respiratoire au repos si aucune gestion de l'environnement et de l'alimentation n'est entreprise [16; 17].

Actuellement, la méthode de référence utilisée sur le terrain permettant de diagnostiquer l'asthme équin est la cytologie sur lavage bronchoalvéolaire anormale chez un cheval présentant des signes cliniques compatibles [15].

## **2.1. Asthme équin sévère**

L'asthme équin sévère, est une condition inflammatoire chronique des voies respiratoires inférieures induite par l'exposition au foin et l'inhalation des poussières, spores et endotoxines qui le contiennent. Cette condition affecte environ 14 % des chevaux vivant dans des régions au climat tempéré [18].

L'asthme équin sévère est caractérisé par deux phases :

- Une phase d'exacerbation, induite par l'exposition aux antigènes, et caractérisée par une détresse respiratoire au repos se qualifiant par un effort expiratoire, une dilatation des naseaux et dans des cas chroniques, par une ligne de contraction musculaire abdominale appelée ligne de pousse. De la toux, du jetage nasal muqueux à mucopurulent, de l'intolérance à l'exercice et de la perte de poids sont également rapportés [17].

- Une phase de rémission asymptomatique, où les signes cliniques sont contrôlés par la gestion de l'exposition aux antigènes comme l'exclusion du foin du milieu de vie du cheval et/ou la mise en place d'un traitement approprié [17].

Lors de l'auscultation pulmonaire des chevaux en exacerbation, des crépitements, surtout à la périphérie du poumon, des sifflements sur toute la surface de l'aire d'auscultation pulmonaire et la présence de sécrétions trachéales peuvent être entendus. Des zones à bas débit d'air apparaissent comme des zones sourdes à l'auscultation pulmonaire lors d'exacerbation sévère. Le test de ventilation forcée par l'apposition d'un sac plastique sur les naseaux n'est pas nécessaire [17].

La difficulté respiratoire est expliquée principalement par la bronchoconstriction, réduisant le passage de l'air et augmentant sa résistance. L'élastance pulmonaire et la pression transpulmonaire mesurées chez des chevaux en exacerbation sont également augmentées comparé au stade de rémission et aux chevaux contrôles sains [19].

L'asthme équin sévère est un syndrome multifactoriel associant le contact avec les antigènes principalement contenus dans le foin, la génétique et l'âge. Le contact avec le foin avant 5 ans d'âge prédispose au développement de l'asthme sévère [18]. Le type de litière ou la durée passée à l'extérieur ne semblent pas influencer les signes respiratoires tels que la toux ou

le jetage nasal [20]. La composante génétique influence l'apparition de la maladie et l'incidence augmente si les deux parents sont asthmatiques sévères [20; 21]. Cette forme affecte principalement les chevaux adultes [22]. Les chevaux présentant de légers signes respiratoires sont prédisposés à développer de l'asthme sévère [23].

La cytologie sur lavage bronchoalvéolaire réalisée lors de l'endoscopie des voies respiratoires inférieures permet de mettre en évidence une neutrophilie pulmonaire normale lors du stade de rémission et une augmentation modérée à sévère ( $> 25\%$ ) lors de l'exacerbation [15]. L'endoscopie des voies respiratoires permet également de mettre en évidence la présence d'une quantité importante de mucus dans la trachée (4-5/5), généralement corrélée avec l'inflammation neutrophilique pulmonaire [24] associée au contact du foin chez les chevaux asthmatiques sévères. Bien qu'il ne soit pas observé chez les chevaux sains, le score de mucus n'est pas spécifique de l'asthme équin [25].

## **2.2. Asthme équin léger/modéré**

Bien que la nouvelle nomenclature d'asthme sévère soit généralement acceptée, celle utilisée pour qualifier l'inflammation légère à modérée des voies respiratoires inférieures est discutée.

L'asthme sévère est bien caractérisé et facilement diagnostiqué du fait de la présence de signe de détresse respiratoire au repos. La phase d'exacerbation est facilement induite et contrôlée, par conséquent ce modèle fait l'objet de nombreuses études. En revanche, les chevaux asthmatiques légers/modérés présentent des signes respiratoires discrets qui rendent difficile le diagnostic. En effet, ces chevaux peuvent présenter uniquement de l'intolérance à l'effort et seront caractérisés d'asthmatiques légers ou de la toux et seront caractérisés d'asthmatiques modérés. Contrairement aux chevaux atteints d'asthme sévère, ils sont asymptomatiques au repos [22] et l'auscultation pulmonaire est généralement normale mais des sifflements sont parfois audibles lors de la réalisation du test de ventilation forcée à l'aide d'un sac plastique [26]. L'intolérance à l'exercice est un critère d'évaluation subjectif et d'origine multifactorielle ; les pathologies respiratoires en sont la deuxième cause après la boiterie [27]. Par conséquent,

cette forme d'asthme est sous diagnostiquée [26]. De plus, l'asthme équin léger/modéré peut être auto-limitant rendant l'étude de ces formes plus difficile.

Dans cette étude, l'asthme léger/modéré sera défini comme un cheval présentant soit de la toux et/ou de l'intolérance à l'exercice combinée à une inflammation pulmonaire mise en évidence par la cytologie du lavage bronchoalvéolaire (neutrophiles  $\geq 5\%$ , mastocytes  $\geq 2\%$  et éosinophiles  $\geq 1\%$ ).

Contrairement à l'asthme sévère, cette forme plus légère d'asthme atteint les chevaux de tous âges [22]. Tout comme l'asthme sévère, la stabulation à l'étable et l'inhalation d'irritants prédisposent à l'apparition du syndrome [28]. Également, une composante génétique ne peut être exclue [15].

Cette pathologie inflammatoire des voies respiratoires inférieures se caractérise par une augmentation du mucus dans la trachée (2 - 5/5) [15], une hyperréactivité des voies respiratoires ainsi qu'une inflammation des voies respiratoires inférieures. Le comptage cellulaire du lavage bronchoalvéolaire est variable en fonction du volume de saline instillé, de la qualité du prélèvement et de la méthode de lecture, par conséquent, un comptage de neutrophiles  $> 5\%$  [15], mastocytes  $> 2\%$  et éosinophiles  $> 1\%$  [26] associés à des signes compatibles à l'asthme léger/modéré est diagnostique du syndrome.

L'exclusion d'autres pathologies respiratoires infectieuses ou non comme l'asthme sévère est nécessaire en plus des critères diagnostiques précédemment cités pour confirmer un diagnostic d'asthme léger/modéré [15].

## **2.3. Traitements**

L'hypoxie observée chez les chevaux asthmatiques en crise résulte des modifications anatomiques et physiologiques des structures respiratoires induites par la bronchoconstriction, le remodelage des tissus bronchiques et l'inflammation pulmonaire. Par exemple, l'accumulation de mucus dans les voies respiratoires diminue la ventilation et altère les échanges gazeux [29]. Le traitement idéal mis en place doit contrôler les conséquences du syndrome tout en limitant autant que possible les effets secondaires.

Le traitement des chevaux asthmatiques sévères est largement étudié. En effet, cette forme très bien caractérisée, est un très bon modèle pour déterminer l'effet thérapeutique d'un traitement par l'évaluation de la fonction respiratoire, de l'inflammation pulmonaire et du remodelage des voies respiratoires. L'effet thérapeutique chez les chevaux asthmatiques légers/modérés qui présentent parfois uniquement de l'intolérance à l'effort et dont l'inflammation pulmonaire est légère est difficilement évaluable et a fait le sujet d'une récente étude [30]. En plus des méthodes utilisées pour évaluer l'effet thérapeutique d'un traitement chez les chevaux asthmatiques sévères, l'hypersensibilité et l'hyperréactivité des voies respiratoires [30] sont également évaluées chez les chevaux asthmatiques légers/modérés. La tolérance à l'exercice évaluée chez ces chevaux, peut être subjective et multifactorielle. Le remodelage bronchique n'est pas encore étudié chez ces chevaux.

Étant donnée les similitudes concernant le caractère inflammatoire aseptique, l'hypersensibilité des voies respiratoires, la bronchoconstriction et la sensibilité antigénique entre ces différentes formes d'asthme, leurs traitements sont basés sur les mêmes principes.

Considérant la sensibilité liée au contact avec l'antigène, l'évitement de celui-ci par la suppression du foin et la mise au pâturage est le traitement le plus favorable dans la gestion de chevaux asthmatiques sévères et sans effet secondaire [31]. Cette régie permet une amélioration de la fonction respiratoire dès les premiers mois ainsi que de l'inflammation pulmonaire à plus long terme (à partir du 6<sup>e</sup> mois) [32; 33]. D'après l'étude de Bullone et collaborateur, la résolution de l'inflammation pulmonaire est beaucoup plus rapide, dès le premier mois, lors de la mise au pâturage [11].

Cependant, une régie à l'extérieur, et surtout en hiver n'est pas toujours envisageable. En cas de vie à l'écurie, la diminution de la fraction de poussière inspirée est primordiale. Une bonne ventilation du bâtiment, un box éloigné de la réserve de foin, une litière de paille remplacée par des copeaux de bois ainsi qu'une alimentation à base d'aliments extrudés ou d'ensilage sont recommandés et contribuent à l'amélioration des signes cliniques des chevaux asthmatiques légers/modérés [34-36]. Les acides gras de type oméga-3 [37] ajoutés à une alimentation extrudée améliorent les signes cliniques des chevaux asthmatiques quelle que soit leur forme. De plus, l'ajout d'anti-oxydants [38] à l'ensilage améliorent les signes cliniques de chevaux asthmatiques sévères.



Si les changements de l'environnement ne sont pas ou que partiellement envisageables, l'utilisation des corticostéroïdes est actuellement le traitement médical le plus efficace. L'association d'un environnement pauvre en antigènes et de corticostéroïdes qu'ils soient inhalés ou par voie entérale améliore de manière similaire la condition respiratoire des chevaux asthmatiques sévères [31], suggérant l'importance de la gestion de l'environnement plutôt que la forme du traitement dans la gestion de l'asthme. Lors de traitement à la fluticasone par inhalation, l'efficacité de la thérapie reste incomplète tant que les chevaux sont gardés dans un milieu riche en antigènes, et l'inflammation pulmonaire n'y est pas contrôlée [33]. En revanche, lorsque la pression antigénique de l'environnement est supprimée, la neutrophilie est contrôlée [39], renforçant le rôle de la gestion de l'environnement dans le traitement.

La dexaméthasone utilisée quotidiennement par voie orale, intraveineuse, ou intramusculaire, améliore la fonction respiratoire des chevaux asthmatiques sévères, de manière similaire à la mise au pâturage et ce, dès 3 jours de traitement [40-42]. La dexaméthasone semble le corticostéroïde le plus efficace dans le traitement de la maladie quel que soit sa forme [30; 41]. Dans le traitement de la forme sévère, d'autres corticostéroïdes tels que l'isoflupredone [40] et la prednisolone [41] administrés quotidiennement se sont montrés efficaces. La triamcinolone acétonide, corticostéroïde retard, améliore également la fonction respiratoires de chevaux asthmatiques sévères lors d'une administration unique par voie intramusculaire [43].

Bien qu'efficaces dans la gestion de la maladie, les corticostéroïdes administrés par voie systémique ne sont pas sans effets secondaires. En effet, lorsqu'utilisés à long terme, une suppression de la sécrétion du cortisol endogène peut conduire à des symptômes d'hypoadrénocorticisme [40; 43; 44], à une altération du métabolisme osseux [45], et à une augmentation de la sensibilité aux infections [46; 47]. La fourbure a longtemps été rapportée comme un effet secondaire, mais semble remise en question dans des études récentes [48].

L'utilisation de corticostéroïdes par inhalation permet de bénéficier d'une action locale, de diminuer la dose efficace nécessaire et de limiter les effets secondaires associés à une administration systémique. Les principaux corticostéroïdes inhalés efficaces dans le traitement de l'asthme équin sévère sont le dipropionate de bécloметasone [49-51] et le propionate de fluticasone [11; 31; 39]. Cette dernière molécule est également efficace dans le traitement de l'asthme léger/modéré par la diminution de l'hypersensibilité des voies respiratoires [30]. Chez

les chevaux asthmatiques sévères, ces deux molécules entraînent également une suppression des glandes surrénales se traduisant par une diminution du cortisol sérique [52; 53]. La fluticasone utilisée en monothérapie ne contrôle pas l'inflammation pulmonaire [11; 30; 31] mais, elle réverse partiellement le remodelage du muscle lisse bronchique des voies respiratoires périphériques et de manière plus rapide que lors de la mise en pâture [11; 33]. Lorsqu'elle est combinée à un  $\beta$ -2 agoniste chez les chevaux asthmatiques sévères, les remodelages du muscle lisse bronchique des voies respiratoires périphériques, de la matrice extracellulaire du muscle lisse bronchique et de la lamina propria des voies respiratoires centrales sont partiellement reversés et la neutrophilie est contrôlée [11].

Que le traitement consiste en la mise au pâturage, et/ou en l'inhalation de corticostéroïdes, une bronchoconstriction résiduelle associée à l'augmentation du muscle lisse bronchique, persiste jusqu'après 12 mois de traitement chez les chevaux asthmatiques sévères [33]. En revanche, celle-ci reste réversible par l'administration d'anticholinergiques tels que l'atropine [43; 54; 55] et le bromure de butylscopolamine [56], de muscariniques antagonistes et de  $\beta$ -2 agonistes tels que le clenbuterol [57-60]. En pratique, l'utilisation d'un bronchodilatateur en aérosol, comme le salbutamol, est préféré car non absorbé systémiquement. Son utilisation semble empirique étant donné l'absence de signes respiratoires au repos chez les chevaux asthmatiques légers/modérés, mais contribue à diminuer la toux et apporte une fluidification du mucus trachéal facilitant la fonction de l'appareil mucociliaire et donc la clairance des voies respiratoires [61]. Chez les chevaux asthmatiques sévères, ils sont utilisés comme complément thérapeutique lors de crise, d'hypoxémie ou encore avant l'inhalation de corticostéroïdes, afin d'augmenter la distribution des particules de corticostéroïdes inhalées. Les bronchodilatateurs n'ont aucun contrôle sur l'inflammation et ne sont pas recommandés comme monothérapie ou dans un environnement non contrôlé [17; 62]. Étant donné les effets indésirables sur la fonction digestive, l'atropine est utilisée uniquement dans le cadre de recherche [63]. En raison de l'absence d'effets secondaires et de l'efficacité d'action similaire bien que plus courte, le bromure de butylscopolamine est préférentiellement utilisé par rapport à l'atropine [56].

## 2.4. Inflammation

L'inflammation non septique des voies respiratoires inférieures est caractérisée par une neutrophilie modérée à sévère chez les chevaux asthmatiques sévères et une neutrophilie légère à modérée chez les chevaux asthmatiques légers/modérés plus âgés. La neutrophilie pulmonaire n'est toutefois pas corrélée à la sévérité de l'obstruction respiratoire. Chez les chevaux asthmatiques légers/modérés, l'inflammation peut être également de type mastocytaire ou éosinophilique. Une augmentation des mastocytes pulmonaires secondaire au contact du foin ou de la paille peut également être mise en évidence chez les chevaux sains ou asthmatiques sévères [64]. Finalement, une éosinophilie pulmonaire, même si cette dernière forme est moins représentée est mise en évidence chez les jeunes chevaux (< 5ans) aux premiers mois de leur entraînement [28; 65].

Une inflammation neutrophilique des voies respiratoires inférieures induite par le contact avec le foin ou un environnement poussiéreux en étable est mise en évidence chez des chevaux sains [66], quel que soit leur âge [67]. Cette neutrophilie reste cependant généralement moindre par rapport à celle observée chez les chevaux asthmatiques sévères en exacerbation dans les mêmes conditions [16; 25; 66]. La neutrophilie est mise en évidence dès 5 heures de contact avec du foin et de la paille [68] suggérant une réponse rapide à l'environnement plutôt que la cause primaire de l'inflammation. De plus la neutrophilie pulmonaire persiste chez des chevaux asthmatiques sévères en rémission lorsqu'ils sont traités avec des corticostéroïdes [11; 30; 31; 33].

Pour le diagnostic de l'asthme équin, les cellules inflammatoires sont mises en évidence dans la lumière des voies respiratoires par le lavage bronchoalvéolaire. Cependant, dans les voies respiratoires centrales, une infiltration de cellules inflammatoires, évaluée par histologie est mise en évidence dans l'épithélium et la matrice extracellulaire. Ces cellules sont présentes en quantité augmentée chez les chevaux asthmatiques sévères en exacerbation par rapport aux chevaux en rémission [69]. L'infiltration de cellules inflammatoires est également présente dans les parois des voies respiratoires périphériques des chevaux asthmatiques sévères quel que soit le statut de la maladie [33] et de manière plus importante au stade d'exacerbation [70]. Plus précisément, une infiltration de cellules inflammatoires majoritairement composée de

neutrophiles et lymphocytes dans l'épithélium [69; 71] est présente. Des mastocytes peuvent également être mis en évidence chez les chevaux asthmatiques sévères consécutivement à une exposition au foin et à la paille [64]. En revanche l'infiltration d'éosinophiles est rare chez les chevaux asthmatiques sévères [72].

## **2.5. Hypersensibilité des voies respiratoires**

L'hypersensibilité des voies respiratoires est mise en évidence chez les chevaux asthmatiques quel que soit leur type et est augmentée lors du contact avec les poussières contenues dans le foin par exemple. Cette hypersensibilité peut persister chez des chevaux asymptomatiques même sans contact avec le foin, ou au pâturage [16]. De plus, elle peut être présente avant même l'apparition de changements de la fonction respiratoire ou de signes cliniques respiratoires [73; 74]. Chez les chevaux asthmatiques légers/modérés, il existe une corrélation positive entre les mastocytes pulmonaires du lavage bronchoalvéolaire et la réactivité des voies respiratoires [74; 75]. Une corrélation positive entre les éosinophiles pulmonaires et l'hypersensibilité a également été mise en évidence chez les jeunes chevaux de course asymptomatiques au repos [73]. En revanche aucune association entre la neutrophilie et l'hypermétabolisme bronchique n'a été mise en évidence [74; 75]. L'hypersensibilité lorsque présente chez ces chevaux est réversée par l'administration de corticostéroïdes, sans effet sur l'inflammation pulmonaire [30] suggérant une pathologie multifactorielle faisant intervenir le remodelage bronchique et l'hypersensibilité du muscle lisse bronchique [16].

## **2.6. Remodelage tissulaire bronchique**

L'augmentation de la quantité de mucus dans la trachée, l'hypersensibilité des voies respiratoires et la bronchoconstriction sont les conséquences des modifications histologiques des tissus pulmonaires, appelé remodelage bronchique. Ce remodelage affecte toutes les composantes des voies respiratoires et augmente avec la sévérité de la maladie [76]. Actuellement, le remodelage central et périphérique des voies respiratoires inférieures n'est étudié que chez les chevaux asthmatiques sévères et sera décrit par la suite. Le remodelage

bronchique entraînant un épaississement des voies respiratoires n'est pas encore défini comme une réponse délétère ou au contraire comme contribuant au maintien de l'architecture des voies respiratoires lors de la phase d'exacerbation.

### **2.6.1. Voies respiratoires centrales**

Le remodelage tissulaire des voies respiratoires centrales est évalué sur des biopsies endobronchiques mais également, pour certaines structures comme le muscle lisse bronchique par l'analyse d'images prises lors d'échographie endobronchique [11; 77]. Toutes les structures des voies respiratoires centrales des chevaux asthmatiques sévères en exacerbation, telles que l'épithélium, la matrice extracellulaire ainsi que le muscle lisse sont remodelées [69; 77-79].

L'hyperplasie épithéliale est mise en évidence chez les chevaux asthmatiques sévères en exacerbation par rapport au stade de rémission. En revanche, il n'existe pas de différence entre les chevaux asthmatiques sévères en rémission et les chevaux sains [69]. Les chevaux asthmatiques en rémission, contrairement aux chevaux sains, présentent une hyperplasie des cellules caliciformes dans l'épithélium de surface [69; 80].

La distance entre la membrane basale et le muscle lisse bronchique est augmentée de manière significative chez les chevaux asthmatiques sévères, comparé aux chevaux contrôles, suggérant une augmentation de l'épaisseur de la lamina propria composée principalement de matrice extracellulaire (MEC) [78]. De plus, l'épaisseur de l'épithélium et de la couche la plus superficielle de la lamina propria dans les voies respiratoires centrales des chevaux asthmatiques sévères, évaluée par échographie endobronchique, n'est pas différente de celle mesurée chez les chevaux contrôles [77].

L'aire absolue du muscle lisse des voies respiratoires centrales est positivement corrélée avec l'âge chez les chevaux asthmatiques qu'ils soient en exacerbation ou en rémission, en revanche ce n'est pas le cas chez les chevaux contrôles [78]. La fraction de muscle lisse évaluée par biopsies endobronchiques est négativement corrélée avec la mesure de la résistance pulmonaire. En effet, l'augmentation de l'épaisseur de la lamina propria chez les chevaux asthmatiques, ne permet pas l'échantillonnage de l'entièreté de la carina, diminuant la fraction

de muscle lisse prélevée [78; 79]. Cependant l'augmentation de la densité des noyaux des myocytes suggère une hyperplasie du muscle lisse chez les chevaux asthmatiques en rémission par rapport aux chevaux contrôles. Les marqueurs de prolifération cellulaire (PCNA) sont augmentés lors d'une exposition antigénique chez les chevaux asthmatiques sévères par rapport aux chevaux contrôles sains dans les mêmes conditions [79]. De plus, l'utilisation de l'échographie endobronchique permet, de manière non invasive, d'évaluer l'augmentation de l'aire du muscle lisse chez les chevaux asthmatiques sévères par rapport aux chevaux contrôles sains. Les mesures du muscle lisse des voies respiratoires centrales évaluées à l'échographie endobronchique corrélient avec celles du muscle lisse des voies respiratoires périphériques évaluées histologiquement [77]. La biopsie endobronchique n'est pas une méthode de prélèvement adéquate pour évaluer l'aire du muscle lisse des voies respiratoires centrales, tout au moins chez les chevaux [78].

Le nombre de glandes à mucus est augmenté dans le muscle lisse des chevaux asthmatiques en rémission par rapport aux chevaux contrôles [69].

Dans l'étude de Herteman et collaborateurs, la néoangiogenèse est évaluée grâce à une technique d'imagerie par bandes spectrales étroites permettant, par la coloration verte et noire des vaisseaux sanguins, d'identifier leur position dans le tissu. Dans la trachée, la densité des vaisseaux superficiels est augmentée chez les chevaux asthmatiques sévères en exacerbation par rapport aux chevaux sains. En revanche, dans la carina et les bronches intermédiaires, la densité des vaisseaux profonds ou superficiels est semblable dans ces deux groupes [81]. Des études basées sur des méthodes histomorphométriques sont nécessaires pour évaluer la néoangiogenèse des voies respiratoires centrales et périphériques des chevaux asthmatiques.

### **2.6.2. Voies respiratoires périphériques**

Le remodelage histologique des voies respiratoires périphériques est mis en évidence par l'étude de biopsies pulmonaires prélevées dans la portion caudale du poumon lors de thoracoscopie, de biopsie transcutanée, ou d'autopsie. Les modifications tissulaires des chevaux asthmatiques sévères se situent principalement dans les voies respiratoires périphériques [82].

L'hyperplasie mais également la desquamation des cellules épithéliales [70; 76; 83], ainsi que l'hyperplasie et la métaplasie des cellules caliciformes sont mises en évidence chez les chevaux asthmatiques sévères [12; 13; 70; 76; 80].

Dans la lamina propria, une augmentation de la fraction de fibres élastiques ainsi que de la fraction du collagène, principalement le collagène 1 et 3, plus importante dans les petites voies respiratoires, a été mise en évidence chez les chevaux asthmatiques sévères en rémission par rapport aux chevaux sains [84]. Le collagène augmenté est associé à la fonction respiratoire et plus précisément, à une augmentation de la résistance pulmonaire chez les chevaux asthmatiques sévères en rémission, suggérant une obstruction résiduelle des voies respiratoires centrales, et un déficit respiratoire au repos. En revanche, le remodelage de la lamina propria ne semble pas associé à la neutrophilie pulmonaire. La fraction de fibres élastiques, chez les chevaux sains est corrélée positivement avec l'élastance pulmonaire, en revanche cette corrélation est perdue chez les chevaux asthmatiques [84]. Nous pouvons donc conclure que le collagène et les fibres élastiques de la lamina propria contribuent à l'obstruction résiduelle de ces voies respiratoires chez les chevaux asthmatiques.

La masse moyenne du muscle lisse bronchique et le nombre de noyaux des myocytes corrigés par le périmètre de la voie respiratoire sont jusqu'à deux à trois fois plus importants chez les chevaux asthmatiques sévères par rapport aux chevaux sains [79; 83]. Cette augmentation de l'aire du muscle lisse est associée aux phénomènes d'hyperplasie principalement [83] et d'hypertrophie [79]. Le facteur de transcription Serum-Response-Factor (SRF) et son cofacteur myocardine (MYOCD gène) semblent contribuer à l'hypertrophie du muscle lisse bronchique dans les voies respiratoires périphériques. En effet ces deux facteurs augmentent dans le muscle lisse bronchique lors du stade d'exacerbation chez les chevaux asthmatiques sévères [85]. Un renouvellement des myocytes, combinant prolifération et apoptose sont présentes de manière augmentée jusqu'à 7 et 6 fois respectivement, chez les chevaux asthmatiques en rémission et en exacerbation par rapport aux chevaux contrôles [83]. Lors du contact avec le foin, ce renouvellement cellulaire est stable chez les chevaux asthmatiques, mais augmente chez les chevaux sains. Cette augmentation demeure inférieure au renouvellement des cellules des chevaux asthmatiques, n'influençant pas la taille du muscle lisse chez les chevaux sains [79].

### **2.6.3. Réversibilité du remodelage bronchique**

Le remodelage bronchique affecte toutes les structures des voies respiratoires centrales et périphériques et altère la fonction respiratoire des chevaux asthmatiques sévères. Les changements structuraux sont partiellement réversibles, et une diminution de la fonction respiratoire peut persister [84] lors de la suppression du stress antigénique associé à l'environnement ou à la mise en place d'un traitement efficace.

Chez l'homme, le muscle lisse bronchique des patients asthmatiques ou diagnostiqués avec une maladie pulmonaire obstructive chronique (COPD) est le principal déterminant dans l'obstruction des voies respiratoires d'où l'intérêt d'étudier sa réversibilité dans le traitement de cette pathologie [86].

L'administration de corticostéroïdes inhalés entraîne une diminution de l'aire du muscle lisse bronchique dans les voies respiratoires périphériques [11; 33]. L'association de corticostéroïdes avec un  $\beta$ -2 agoniste entraîne une diminution de l'aire du muscle lisse plus précocement dans les voies respiratoires centrales et périphériques [11]. La suppression du stress antigénique entraîne également une diminution de l'aire du muscle lisse, mais plus tardivement [11]. La diminution de l'aire du muscle lisse est associée à la diminution du nombre de noyau dans les voies respiratoires périphériques. La suppression de l'exposition antigénique, l'administration de corticostéroïdes ou de  $\beta$ -2 agoniste entraînent une diminution de la taille des myocytes dans les voies respiratoires centrales. Dans les voies respiratoires périphériques, seule la mise en pâture est efficace dans la diminution de la taille des myocytes [11].

Dans les voies respiratoires centrales et périphériques, la fraction de matrice extracellulaire dans le muscle lisse bronchique diminue lors d'un traitement combinant un corticostéroïde et un  $\beta$ 2 agoniste tous deux inhalés [11].

L'administration d'un  $\beta$ -2 agoniste seul ou de la combinaison corticostéroïde +  $\beta$ -2 agoniste entraîne dans les voies respiratoires centrales, une diminution de l'épaisseur de la matrice extracellulaire dans la lamina propria [11]. Ces changements sont également observés



dans les voies respiratoires périphériques, plus tardivement lors de traitement à base de corticostéroïdes seuls ou de la mise en pâture [33].

Le remodelage du muscle lisse périphérique est très sensible aux médiateurs de l'inflammation, en revanche, il ne corrèle pas avec l'inflammation pulmonaire [11].

### **3. Méthodes diagnostiques**

#### **3.1. Cytologie : Lavage bronchoalvéolaire**

La cytologie du lavage bronchoalvéolaire est actuellement la méthode de référence pour le diagnostic de l'asthme équin.

Le protocole de prélèvement de lavage bronchoalvéolaire n'est pas standardisé, car réalisé en fonction du matériel disponible. Cependant d'après le Workshop International de 2001 traitant des pathologies chroniques des voies respiratoires des chevaux, il est recommandé d'instiller 200 à 500 ml de saline 0,9 % stérile à 37°C par un endoscope (2 m de long) ou par un tube de lavage bronchoalvéolaire de 3 m de long et 10 - 13 mm de diamètre [87]. Si un volume de 200 ml est utilisé, il est instillé et aspiré en une fois, en revanche, si le volume est plus important, tel que 500 ml, il est alors instillé et réaspiré en deux fois [15]. Le volume récolté et analysé constitue entre 40 et 60 % du volume administré, mais peut parfois être inférieur dans le cas des chevaux asthmatiques sévères [87].

Chez les chevaux sains, les deux populations cellulaires retrouvées en majorité sont les macrophages (60 %) et les lymphocytes (35 %). Les autres cellules telles que les neutrophiles, les mastocytes et les éosinophiles sont présentes en quantité moindre [15; 87].

Chez les chevaux asthmatiques sévères en exacerbation, les populations relatives de neutrophiles augmentent de manière modérée à sévère et celles de macrophages et lymphocytes diminuent. En revanche, chez les chevaux asthmatiques légers/modérés, la neutrophilie n'est que légèrement augmentée de même que l'inflammation mastocytaire et éosinophilique [15].

Étant donné le caractère diffus de l'inflammation pulmonaire chez les chevaux asthmatiques sévères, l'échantillonnage d'un seul lobe est suffisant pour mettre en évidence l'inflammation [88].

La cytologie du lavage bronchoalvéolaire est très sensible, mais malheureusement peu spécifique pour le diagnostic de l'asthme équin [89]. L'inflammation pulmonaire peut être en effet associée aux poussières inhalées trouvées dans le foin, par conséquent, des chevaux sains peuvent également présenter une neutrophilie pulmonaire augmentée [66].

Étant donné le manque de corrélation de la cytologie entre le lavage bronchoalvéolaire et le lavage trachéal, cette dernière technique ne constitue pas une bonne alternative diagnostique [90-92].

Une méthode idéale pour diagnostiquer l'asthme est l'évaluation de la fonction respiratoire. Cependant, aucun appareil portable n'est actuellement disponible pour effectuer des évaluations de terrain, ces techniques sont principalement utilisées en recherche.

### **3.2. Histologie**

L'analyse histologique de tissus pulmonaires a surtout été utilisée à des fins diagnostiques lors principalement de suspicion de maladies interstitielles ou infiltratives [93]. Elle peut être réalisée sur des biopsies endobronchiques pour évaluer les voies respiratoires centrales et sur biopsies transcutanées ou thoracoscopiques pour évaluer les voies respiratoires périphériques et le parenchyme pulmonaire. L'évaluation de ces types de biopsies présente certains avantages et inconvénients liés à la procédure.

Le laboratoire de recherche sur l'asthme équin dirigé par Dr Lavoie, développe actuellement des méthodes afin d'évaluer, chez les chevaux asthmatiques, les changements histologiques précoces des voies respiratoires et la réponse du remodelage bronchique à un traitement mis en place [11; 33; 69; 77-79; 81; 84; 94].

Les biopsies endobronchiques sont prélevées lors de la réalisation de l'endoscopie des voies respiratoires inférieures sous sédation légère. Elles permettent d'évaluer le remodelage des voies respiratoires centrales. La technique est facile à réaliser, minimalement invasive et

sécuritaire pour l'animal. La qualité du muscle lisse est améliorée lorsque les biopsies sont prélevées dans les petites carina avec une pince à biopsie arrondie aux extrémités mousses (2,85 mm) [78] (figure 2). Cette pince à biopsie est insérée dans le canal de travail de l'endoscope et après instillation d'anesthésique local sur la carina à prélever, celle-ci est biopsiée (2 mm<sup>2</sup>) puis immédiatement placée dans du formol [95]. Les biopsies endobronchiques permettent d'évaluer le remodelage des premières bifurcations bronchiques. Un prélèvement ne peut être réalisé à la même place lors de d'évaluations rapprochées, en effet, le site de biopsies est démontré cicatrisé 2 mois après le prélèvement [95]. Par conséquent, l'évaluation à court terme de l'effet d'un traitement sur le remodelage des voies respiratoires centrales prélevées par biopsie endobronchique est limitée [82].

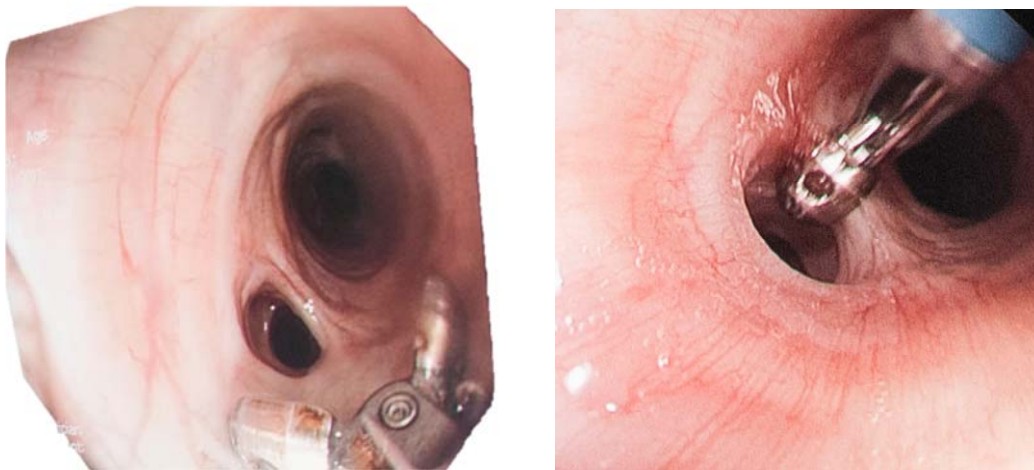


Figure 2. Procédure : Site de prélèvement et prélèvement d'une biopsie endobronchique par endoscopie.

Les voies respiratoires périphériques peuvent être échantillonnées par thoracoscopie du 15<sup>e</sup> espace intercostal, sous sédation plus importante que pour les biopsies endobronchiques ou en post-mortem lors de l'autopsie. La thoracoscopie est une technique chirurgicale minimalement invasive. Elle permet de prélever une biopsie pulmonaire de grande taille sur laquelle plusieurs voies respiratoires sont histologiquement évaluables [93]. Le remodelage des voies respiratoires périphériques est plus important que celui des voies respiratoires centrales chez les chevaux asthmatiques sévères, d'où l'intérêt d'évaluer cette portion du poumon [82].

Cependant, le nombre de biopsies thoracoscopiques prélevé et l'évaluation de l'effet d'un traitement sur le remodelage du poumon périphérique sont limités. Cette technique est utilisée principalement en recherche.

Les voies respiratoires périphériques sont également évaluables par un prélèvement transcutané [96] effectué entre le 7<sup>e</sup> et le 8<sup>e</sup> espace intercostal à l'aide d'une aiguille à biopsie. La procédure, minimalement invasive, est réalisée sur cheval debout sans sédation, après une anesthésie locale de la zone à biopsier. En raison de la petite taille des biopsies obtenues de nombreux échantillons doivent être prélevés. Le nombre de voies respiratoires évaluables est inférieur par rapport à celui obtenu lors de thoracoscopie, cette dernière technique est alors préférée par rapport à la biopsie transcutané. En plus de la quantité limitée du prélèvement, cette technique n'est pas sans complication, en effet, les principales rapportées par des spécialistes sont l'hémorragie pulmonaire, la tachypnée et la détresse respiratoire [97; 98].

Les colorations de routine disponibles en laboratoire qui permettent de différencier le collagène, du muscle lisse et d'identifier les noyaux sont les colorations Hématoxyline et Éosine (H&E), Hématoxyline Phloxine Safran (HPS) ou Hématoxyline Éosine Phloxine Safran (HEPS). Il existe également des colorations spéciales pour mettre en évidence des composantes spécifiques au sein du tissu telles que les fibres élastiques avec la coloration Hématoxyline Verhoeff, ou la mucine avec la coloration bleu alcian. La méthode de coloration, regroupant les colorations de routine et spécifiques, permettant de colorer toutes les structures d'une voie respiratoires est le pentachrome MOVAT. La version modifiée par Russell, plus rapide à effectuer est préférentiellement utilisée [99]. Cette coloration est obtenue par la combinaison de 5 colorants : le bleu alcian 1 %, l'hématoxyline alcoolique 10 %, le chlorure ferrique 2 %, la crocéine scarlet associée à la fuchsine acide puis le safran Gatinais. Les différentes structures de la biopsie pulmonaire sont colorées tels qu'il suit : les noyaux et fibres élastiques sont colorées en noir, le muscle lisse en rose, la mucine contenue dans les cellules caliciformes et dans les glandes à mucus est colorée en bleue, la matrice extracellulaire contenant du collagène de type III est colorée en jaune (figure 3).

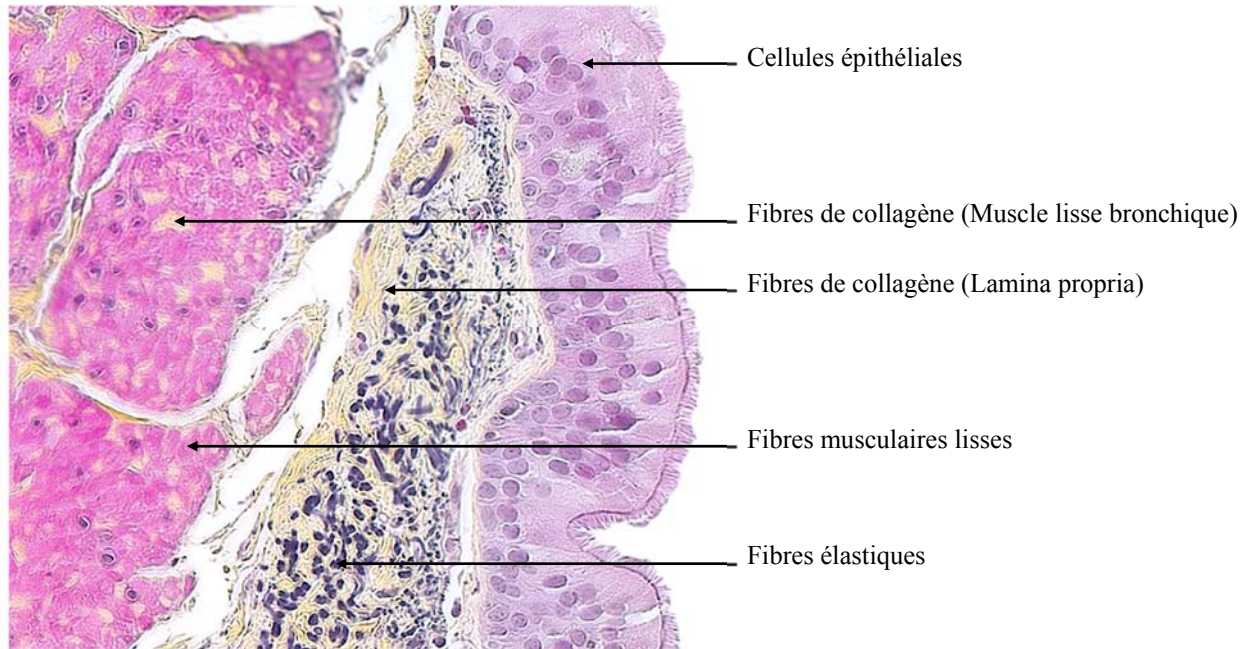


Figure 3. Biopsie endobronchique, coloration pentachrome MOVAT. Grossissement 400X.

### 3.2.1. Score de qualité histologique de biopsies endobronchiques

Le score de qualité histologique de biopsie est un score semi-qualitatif sur 5 points. Il permet de caractériser l'orientation de la biopsie endobronchique, par la succession physiologique des différents tissus le composant (épithélium - matrice extracellulaire - muscle lisse – cartilage si présent), ainsi que l'intégrité de la biopsie (figure 4). Un score de 5/5 correspond à une biopsie très bien orientée et dont l'architecture est très bien conservée. En revanche, un score de 1/5 est une biopsie inexploitable avec une mauvaise orientation du tissu. Un score d'au moins 3/5 permet de sélectionner des biopsies de bonne qualité et bien orientées [78] afin de réaliser de manière fiable les différentes mesures histomorphométriques ou d'appliquer un score histologique semi-quantitatif.

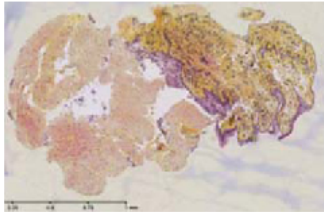
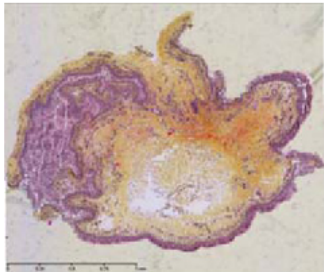
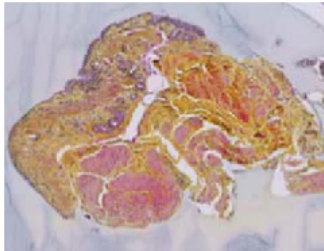
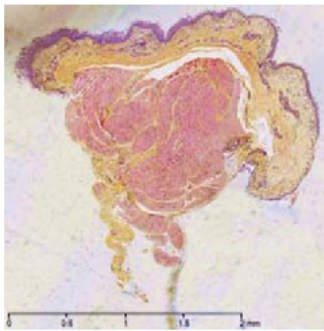
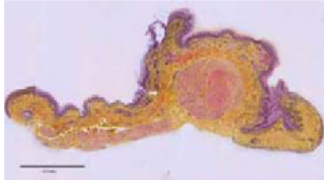
Biopsie	Score	Description
	1	Orientation du tissu inacceptable, absence de continuité entre l'épithélium, la matrice extracellulaire et le muscle lisse
	2	Bonne orientation du tissu, architecture pas complètement préservée
	3	Bonne orientation du tissu, architecture préservée dans une certaine portion de la biopsie (> 50%)
	4	Orientation optimale pour l'entièreté de la biopsie, zone mineure où la continuité entre les tissus est perdue
	5	Orientation optimale pour l'entièreté de la biopsie, l'architecture des tissus est parfaitement conservée. Les bords parenchymateux de la couche de muscle lisse sont clairement identifiables

Figure 4. Score de qualité histologique de biopsies endobronchiques. *Modifiée de [78].*

### 3.2.2. Histomorphométrie

L'histomorphométrie est une méthode qui, de manière quantitative, vise à évaluer la morphologie et la composition bidimensionnelle de coupes histologiques de biopsies [100].

L'utilisation de la méthode par comptage de point est très rapide et permet d'évaluer l'aire d'un tissu et la fraction d'une structure dans ce tissu [100]. Sur l'image histologique est réparti de manière aléatoire, mais régulière, un quadrillage de points, tel que chaque point correspond à une aire fixe. L'identification des points croisant la structure tissulaire étudiée, permet de calculer l'aire de celle-ci ou sa composition en fonction du critère évalué. Plus le nombre de points répartis sur la biopsie est faible, plus l'aire associée à chaque point est grande, et moins l'évaluation de l'aire du tissu sera précise. À l'inverse pour une même biopsie, plus le nombre de point sur la biopsie est important, plus l'aire associée à chaque point sera petite, et plus la mesure sera précise, cependant, le comptage de tous les points croisant la structure sera fastidieux. Il a été mis en évidence que l'évaluation de 200 points par structure permet d'évaluer de manière fiable l'aire de celle-ci [100]. Plus la surface du tissu à évaluer est grande, plus la fréquence de points nécessaires pour obtenir 200 points identifiés dans le tissu sera faible. La mesure de l'aire d'un tissu est calculée en multipliant l'aire d'un point par le nombre de points identifiés dans ce tissu. La fraction des tissus dans la biopsie est obtenue en divisant le nombre de points dans le tissu observé par le nombre de points total dans la biopsie [100]. L'évaluation de la fraction d'une structure au sein d'un tissu, tel que l'évaluation de la fraction du collagène au sein du muscle lisse, évaluant ainsi la fibrose musculaire peut être réalisée de la même manière. Cette technique a déjà été utilisée pour évaluer la masse du muscle lisse bronchique dans les biopsies endobronchiques de chevaux asthmatiques sévères [78]. Cette technique permet également d'évaluer des volumes ou les limites de certains tissus.

D'autres techniques permettent également d'évaluer, par des mesures directes, des aires de tissus ou des distances entre ceux-ci. En effet, le logiciel ImageJ est utilisé pour mesurer par exemple, la distance entre la membrane basale et le muscle lisse [77; 78]. L'aire peut également être mesurée de manière informatisée. Par exemple, les couleurs de la biopsie peuvent être modifiées suivant un seuil de couleurs, tel que le tissu évalué représenté par une couleur peut être soustrait du reste de la biopsie. Cette technique est utilisée dans différentes études pour mesurer l'aire de la lamina propria [33] ou l'aire du collagène dans la lamina propria [84].

D'autres logiciels sont également disponibles et permettent de mesurer des aires, tels que l'aire du muscle lisse bronchique dans les études de Leclère et collaborateurs [33; 79].

### **3.2.3. Score histologique semi-quantitatif de biopsies endobronchiques**

Sur base des changements histologiques mis en évidence dans des études précédentes, un score semi-quantitatif visant à évaluer le remodelage des voies respiratoires centrales a été mis en place [69].

Le score semi-quantitatif est rapide à effectuer. Un total de 14 points permet d'évaluer de manière semi-quantitative, les différentes structures telles que l'épithélium, la matrice extracellulaire et le muscle lisse au travers de différents critères scorés de 0 à 1 ou 0 à 2 (figure 5) [69].

Un score  $\geq 5$  permet, avec une sensibilité de 54 % et une spécificité de 79 %, de différencier un cheval asthmatique sévère, quel que soit la phase de rémission ou d'exacerbation, d'un cheval sain. Il permet aussi, avec une sensibilité de 83 % et une spécificité de 77 %, de différencier un cheval asthmatique sévère en exacerbation d'un cheval asthmatique sévère en rémission et d'un cheval sain. Les scores d'infiltration de cellules inflammatoires dans l'épithélium et dans la matrice extracellulaire permettent individuellement de différencier de manière significative les deux phases d'un cheval asthmatique sévère. De plus, l'hyperplasie épithéliale est augmentée, bien que de manière non significative ( $p = 0,06$ ) chez les chevaux asthmatiques sévères en exacerbation par rapport aux chevaux en rémission. Le score total ne permet pas de différencier un cheval asthmatique en rémission d'un cheval contrôle sain. En revanche, la fraction de cellules caliciformes dans l'épithélium et de glandes à mucus dans le muscle lisse bronchique, sont tous deux augmentés chez les chevaux asthmatiques sévères en rémission par rapport aux chevaux contrôles [69].

Chez les chevaux asthmatiques sévères, tout stade confondu, ce score semi-quantitatif total est corrélé positivement avec la fonction respiratoire, démontrant une corrélation structure/fonction et donc un réel rôle du remodelage bronchique dans la fonction respiratoire même chez les chevaux en rémission et asymptomatiques [69].



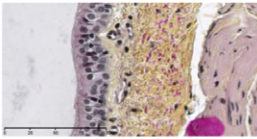
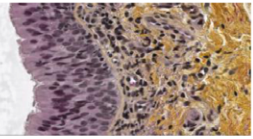

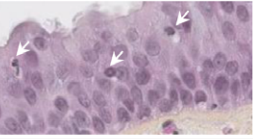
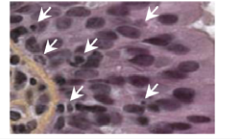
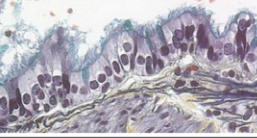
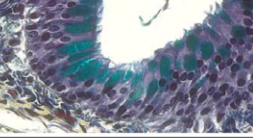
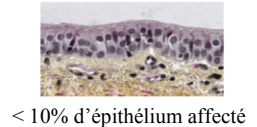
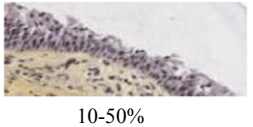
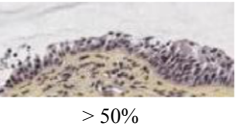
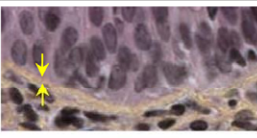

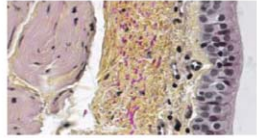
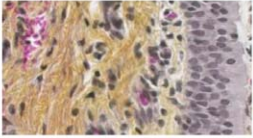
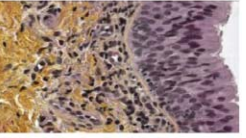
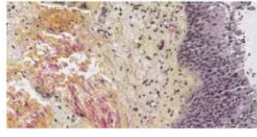
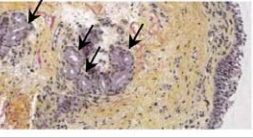
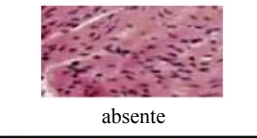
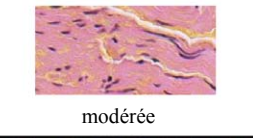
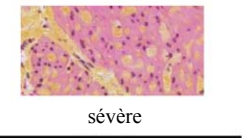
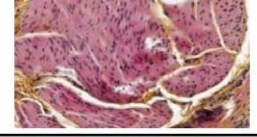
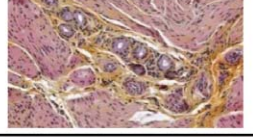
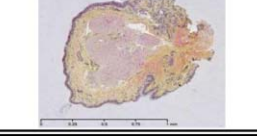
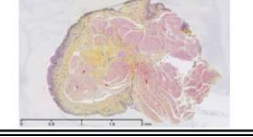
Paramètres évalués		Valeurs possibles		
		0	1	2
E P I T H É L I U M	Hyperplasie			-
	Infiltration inflammatoire			
	Hyperplasie cellules caliciformes			-
	Desquamation	 < 10% d'épithélium affecté	 10-50%	 > 50%
M E C	Épaisseur membrane basale	 ↓ ↓	 ↓ ↓	-
	Cellules inflammatoires sous muqueuse			
	Glandes à mucus		 ↓ ↓ ↓	-
M L	Fibrose	 absente	 modérée	 sévère
	Glandes à mucus			-
	Fin ML visible			-

Figure 5. Score histologique semi-quantitatif de biopsies endobronchiques. *Modifiée de [69].*

### **3.3. Imagerie**

L'échographie endobronchique (EBUS) est une procédure d'imagerie peu invasive réalisée lors de l'endoscopie des voies respiratoires inférieures. Elle consiste en un scan transversale des parois des bronches à l'aide d'une sonde à ultra-sons insérée dans le canal de travail de l'endoscope [82]. L'échographie endobronchique a été validée chez le cheval et permet d'évaluer les différentes couches des parois des voies respiratoires centrales et particulièrement L2, composée de 75 % du muscle lisse bronchique et 25 % de matrice extracellulaire [77]. Contrairement aux biopsies endobronchiques, l'EBUS permet d'évaluer de manière répétée dans le temps, les mêmes voies respiratoires lors d'étude évaluant l'effet d'un traitement sur le remodelage des voies respiratoires centrales. Cependant, les images échographiques sont beaucoup moins précises que les images histologiques [77].

D'autres techniques d'imageries sont disponibles mais présentent certaines limites. La radiographie est principalement utilisée pour un diagnostic d'exclusion, en effet, elle ne permet pas de diagnostiquer un cheval asthmatique léger/modéré [15], et seulement un léger épaississement interstitiel est mis en évidence chez les cas chroniques d'asthme sévère [17].

La scintigraphie est également une technique disponible et sensible pour mettre en évidence des lésions épithéliales pulmonaires, par la modification du taux de clairance alvéolaire, chez des chevaux asthmatiques sévères en rémission dépendamment de l'environnement. Chez ces chevaux en rémission, aucun signe clinique ou modification de la fonction respiratoire n'a été mis en évidence [101].

### **3.4. Fonction respiratoire**

L'obstruction des voies respiratoires centrales et périphériques, représentée respectivement par la résistance et l'élastance pulmonaires, ainsi que l'effort développé par le cheval pour respirer, sont évalués par des instruments de mesure de la fonction respiratoire. Actuellement aucun dispositif portable n'est disponible pour une utilisation de terrain.

### **3.4.1. La mécanique respiratoire standard**

La mécanique respiratoire standard est une méthode permettant d'évaluer la résistance ( $R_L$ ) et l'élastance ( $E_L$ ) pulmonaires et la pression transpulmonaire ( $\Delta P_L$ ). Cette technique nécessite le placement d'un cathéter naso-oesophagien jusqu'au 1/3 distal de l'œsophage à l'extrémité duquel un ballonnet est légèrement gonflé d'air (5 ml). Le ballonnet perçoit à chaque respiration la pression transpleurale. Un masque à l'extrémité duquel est placé un pneumotachographe est positionné sur le nez du cheval. Ce dispositif permet de mesurer le flux d'air inspiré et expiré à chaque mouvement respiratoire. Ces données ainsi mesurées sont par la suite amplifiées et intégrées dans une équation de régression linéaire permettant de calculer la résistance et l'élastance pulmonaires :  $\Delta P_L = E_L \times V + R_L \times \dot{V} + K$ , où  $V$  est le volume,  $\dot{V}$  est le flux d'air et  $K$  est la pression transpulmonaire en fin d'expiration [102].

La résistance et l'élastance pulmonaires d'un cheval sain sont inférieures à 1 cm H<sub>2</sub>O/L/s et 1 cm H<sub>2</sub>O/L respectivement. La pression transpulmonaire varie de 4-8 cm H<sub>2</sub>O chez un cheval sain, est inférieure à 10 cm H<sub>2</sub>O chez un cheval asthmatique léger/modéré et est supérieure à 15 cm H<sub>2</sub>O chez un cheval asthmatique sévère en exacerbation [15; 103]. La mise en évidence de restriction respiratoire est alors facile à mettre en évidence chez les chevaux asthmatiques sévères en exacerbation mais plus difficile chez les chevaux asthmatiques légers/modérés et des méthodes plus sensibles sont nécessaires [15; 89].

### **3.4.2. La mécanique par oscillométrie**

La mécanique par oscillométrie telle que, la technique d'oscillation forcée (FOT) ou le système d'oscillométrie d'impulsion (IOS), permettrait l'évaluation de la fonction respiratoire de manière plus sensible que la mécanique respiratoire standard [104] par la mesure de la résistance et de la réactance pulmonaire.

Il s'agit d'un dispositif non invasif puisqu'il nécessite uniquement le positionnement d'un masque sur les naseaux du cheval à l'extrémité duquel est placé un haut-parleur générateur de fréquences multiples. Lors de l'utilisation de l'IOS, la fréquence des ultra-sons est variable contrairement à la technique d'oscillation forcée. La réponse au signal du flux de pression imposé à la respiration de l'animal est mesurée par un transducteur de pression connecté à un

pneumotachographe placé également à l'extrémité du masque. Les données sont alors enregistrées et analysées par un logiciel puis transformées pour obtenir la résistance et la réactance du système respiratoire à différentes fréquences à partir de 1 Hz [105]. Les résistances obtenues à basses fréquences (5 Hz) permettent d'évaluer l'entière des voies respiratoires, à l'inverse, les résistances obtenues à hautes fréquences (20 Hz) évaluent les voies respiratoires larges. Chez l'humain, la résistance obtenue à 20 Hz réduite par celle obtenue à 5 Hz permet d'évaluer la résistance des petites voies respiratoires [106]. Chez le cheval, l'utilisation de basses fréquences tel que 5 Hz est plus sensible et représente mieux la fonction respiratoire, de plus, le ratio  $R5 : R10$  est un très bon indicateur d'obstruction des petites voies respiratoires [104].

Cette technique permet de mettre en évidence une augmentation de la résistance et une diminution de la réactance chez les chevaux asymptomatiques diagnostiqués avec de l'asthme léger/modéré sur base de la cytologie du lavage bronchoalvéolaire, par rapport aux chevaux sains [107].

### **3.4.3. Autres méthodes**

La mesure de l'expiration forcée est une technique qui combine, le système de mécanique respiratoire standard permettant la mesure de la pression transpulmonaire par le cathéter naso-oesophagien, et un cathéter nasotrachéal. Le cheval est alors ventilé mécaniquement puis manuellement à sa capacité pulmonaire maximale par ce dernier cathéter. L'expiration forcée est induite par l'exposition des voies respiratoires à un réservoir sous vide séparé du cathéter trachéal par une valve 3-voies [108]. Cette technique plus sensible et plus spécifique, permet d'identifier de manière précoce l'obstruction de voies respiratoires de chevaux asthmatiques sévères et légers/modérés asymptomatiques [89]. Cette technique est rarement utilisée chez les chevaux car très invasive et nécessite une sédation importante.

La mesure de l'hyperréactivité bronchique consiste en l'exposition d'une concentration croissante d'histamine nébulisée au travers d'un masque placé sur les naseaux. La fonction respiratoire est évaluée entre deux expositions. La dose d'histamine ou de méthacholine à laquelle la fonction respiratoire est modifiée (augmentation de la résistance et diminution de la

compliance pulmonaire) correspond au niveau de sensibilité. Les chevaux sains ne présentent pas d'hyperréactivité bronchique, contrairement aux chevaux présentant une inflammation sévère des voies respiratoires [109; 110].

## **Hypothèse et Objectifs**

Considérant l'altération de la fonction respiratoire dans les formes légère/modérée et sévère de l'asthme, et les altérations structurales des voies respiratoires centrales dans cette dernière forme, l'hypothèse de la présente étude est qu'il existe un remodelage des voies respiratoires centrales chez certains chevaux asthmatiques légers/modérés et que celui-ci contribue à la progression de la maladie.

Nos objectifs sont tout d'abord à l'aide de méthodes histomorphométriques, de déterminer la présence de remodelage tissulaire bronchique dans les voies respiratoires centrales des chevaux asthmatiques légers/modérés. Et si celui-ci est présent, d'évaluer la fiabilité du score semi-quantitatif pour l'identification des altérations morphologiques des voies respiratoires centrales.

# Matériel et Méthodes

## 1. Protocole expérimental

Ce projet s'inscrit dans le cadre d'une étude contrôlée, randomisée à l'aveugle, réalisée sur des biopsies endobronchiques, issues de la biobanque de tissus respiratoires équins (BTRE), prélevées chez des chevaux asthmatiques légers/modérés et contrôles sains présentés à la l'Hôpital Équin de la faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal lors d'une étude antérieure entre 2015 et 2016. Seuls deux chevaux, un cheval contrôle et un cheval asthmatique ont été présentés en 2013 et 2014 respectivement. Toutes les procédures expérimentales réalisées sur les chevaux ont été acceptées par le comité de bien-être animal de l'Université de Montréal (Rech-1647). Tous les propriétaires ont signé un formulaire de consentement après avoir pris connaissance d'un document expliquant l'objectif et le protocole de l'étude.

Les chevaux présentés à l'Hôpital Équin pour consultation respiratoire (n = 39) et les chevaux contrôles sains pour dons (n = 21) étaient soumis au même protocole dès leur arrivée. Une anamnèse, un examen physique ainsi qu'une hématologie étaient réalisés. Une endoscopie des voies respiratoires supérieures permettait d'attribuer un score semi-quantitatif évaluant l'accumulation de mucus trachéal (/5), basé sur le score de Gerber et collaborateur [111] (figure 6). L'endoscopie des voies respiratoires inférieures a permis de réaliser un lavage bronchoalvéolaire pour une analyse cytologique, et avec accord du propriétaire, un prélèvement de 4 à 6 biopsies endobronchiques. Un lavage trachéal et des radiographies pulmonaires ont été effectués sur certains chevaux pour compléter l'examen, mais leurs résultats ne seront pas utilisés dans cette étude en raison du manque de données.

L'endoscopie des voies respiratoires a été réalisée avec un endoscope de 13 mm de diamètre et 1,6 m de longueur. Le lavage bronchoalvéolaire a été réalisé par l'instillation à deux reprises de 250 ml de saline 0,9 % stérile espacées par une aspiration du liquide de lavage. Les cytologies utilisées dans cette étude ont été lues par une pathologiste certifiée, Dre Carolyn Grimes. Les biopsies endobronchiques ont été prélevées dans les petites carina à l'aide d'une pince à biopsie ovale aux extrémités mousses (2,85 mm de diamètre). Deux biopsies ont été

conservées dans une solution de conservation d'ARNlater® et les biopsies restantes ont été fixées dans la formaline, puis enrobées en paraffine dans des cassettes histologiques.

Toutes les procédures et méthodes utilisées ont été préalablement validées lors d'études antérieures.

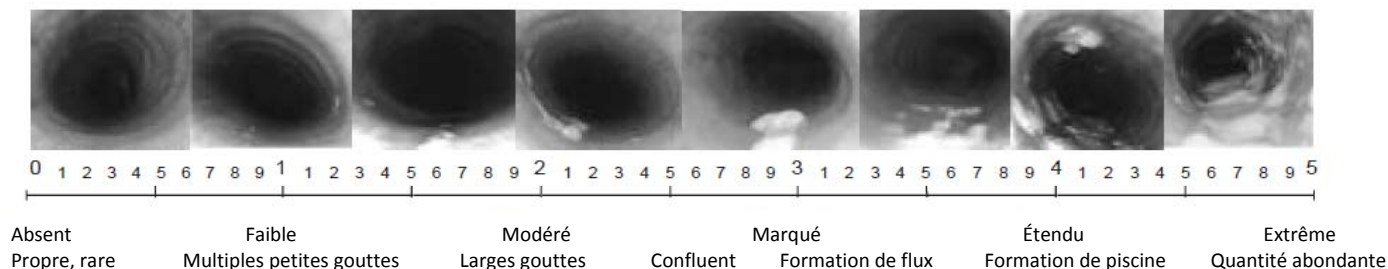


Figure 6. Score d'évaluation de l'accumulation de mucus trachéal. *Modifié de [111].*

## 1.1. Critères d'inclusion

Tous les chevaux inclus dans cette étude devaient être en santé, présenter une hématologie normale ou compatible avec l'âge et la race. Au moins une biopsie devait avoir été prélevée et conservée en paraffine.

Les chevaux sains devaient présenter une anamnèse normale, sans antécédent de pathologie chronique. De plus, la cytologie du lavage bronchoalvéolaire devait être non-inflammatoire, avec les neutrophiles  $< 5\%$ , les mastocytes  $< 3\%$  et les éosinophiles  $\leq 1\%$ . Le remodelage des voies respiratoires centrales des chevaux sains avec une inflammation pulmonaire mastocytaire  $\leq 2\%$  a également été évalué et les différences significatives après le retrait des chevaux avec une inflammation mastocytaire  $> 2\%$  sont présentées en annexe.

Les chevaux asthmatiques devaient présenter une anamnèse compatible avec l'asthme équin léger/modéré, soit présenter de l'intolérance à l'effort et/ou de la toux. Le LBA devait être inflammatoire, tel que la population cellulaire devait être représentée par des neutrophiles  $\geq 5\%$  et/ou des mastocytes  $\geq 2\%$  et/ou des éosinophiles  $\geq 1\%$ .



## **1.2. Critères d'exclusion**

Les chevaux diagnostiqués avec une autre pathologie respiratoire (infectieuse ou non telle que l'asthme équin sévère) ou systémique (pour les deux groupes de chevaux) ont été exclus de l'étude.

## **2. Colorations**

Antérieurement à cette étude, les biopsies endobronchiques des chevaux ont été colorées au bleu alcian et au HEPS par le service de pathologie.

Au cours de cette étude, des biopsies additionnelles ont été coupées au microtome à une épaisseur de 4 µm. Un minimum de 4 et un maximum de 8 biopsies ont été placées par lame de manière aléatoire, permettant de colorer toutes les biopsies en une coloration. Suivant le déparaffinage au xylène et l'hydratation progressive dans des bains d'alcool à concentration décroissante (100 %-75 %), la coloration pentachrome MOVAT est obtenue par la combinaison de 5 bains de colorants : le bleu alcian 1%, l'hématoxyline alcoolique 10 %, le chlorure ferrique 2 %, la crocéine scarlet associée à la fuchsine acide puis le safran Gatinais (protocole en annexe). La déshydratation des biopsies a été effectuée dans des bains d'alcool à concentration croissante, séchées au xylène puis mis sous lamelle. Cinquante-cinq biopsies ont été colorées lors d'une première coloration. Une biopsie additionnelle ainsi que vingt-deux biopsies précédemment colorées, mais de qualité insuffisante, ont été coupées et colorées lors d'une deuxième coloration.

## **3. Score de qualité histologique**

Le score de qualité histologique a été évalué sur toutes les biopsies endobronchiques coupées et colorées au MOVAT (n = 78). Ce score permet sur une échelle de 1 à 5 de caractériser de manière semi-quantitative, l'orientation et l'intégrité du tissu (figure 4). Un score de 5/5 caractérise une biopsie très bien orientée, la succession physiologique des tissus est retrouvée

(épithélium-lamina propria-muscle lisse bronchique) et la conservation des tissus est de très bonne qualité. En revanche, un score de 1/5 caractérise une biopsie dont l'orientation est inacceptable [78]. Les biopsies avec un score de qualité supérieur ou égal à 3/5, et les biopsies ne contenant pas de muscle mais qui étaient bien orientées et avec une bonne intégrité du tissu, étaient jugées acceptables et ont été conservées pour les analyses suivantes. Lorsque les biopsies ne contenaient pas de muscle lisse, une seconde biopsie en contenant était ajoutée.

## **4. Histomorphométrie**

L'histomorphométrie a été réalisée sur les biopsies sélectionnées sur base du score de qualité histologique. Les biopsies sélectionnées ont été numérisées au grossissement 400X à l'aide du logiciel Panoptiq (ViewsIQ, version 1.4.3) connecté à une caméra digitale Leica (DCF320, Leica Microsystems, Cambridge, UK). La moyenne des mesures, lorsqu'effectuée sur deux biopsies par cheval a été utilisée pour évaluer les structures.

### **4.1. NewCAST**

Habituellement utilisé comme module de stéréologie, dans cette étude newCAST (version 6.5.2.2303 ; Visiopharm, Hoersholm, Danemark) nous a permis d'évaluer de manière bidimensionnelle les tissus par la mesure de leurs aires grâce à un système de comptage de points. Chaque biopsie est divisée en cadre de travail de taille égale. Chaque cadre est recouvert de croix placées de manière régulière où chaque croix est caractérisée par une aire fixe. Le comptage de 200 points par tissu évalué est considéré comme fiable [100]. Plus le tissu à évaluer est grand, plus le nombre de croix par cadre nécessaire pour obtenir un comptage de 200 points par tissu sera diminué, et l'aire associée sera grande. À l'inverse, si l'aire du tissu à évaluer est petite, le nombre de croix par cadre sera augmenté et l'aire de chaque croix sera plus petite. Toutes les croix interceptant un tissu d'intérêt seront identifiées et prises en compte dans l'évaluation de l'aire de celui-ci. En revanche, les croix n'interceptant aucun tissu ne seront pas prises en compte. Si l'identification d'une croix pour un tissu n'était pas claire au grossissement

400X, l'image était alors grossie à l'aide du logiciel utilisé jusqu'à l'identification des pixels composant l'image, par convention, la couleur du pixel en haut à droite de la croix déterminait le type de tissus.

Les critères suivants ont été mesurés sur toutes les biopsies colorées au MOVAT : aire totale de la biopsie (figure 7), aire de l'épithélium, aire de la matrice extracellulaire, aire du muscle lisse (figure 8) (quand il était présent). L'aire des tissus a été calculée en  $\mu\text{m}^2$  comme suit : *nombre de croix dans le tissu x aire d'une croix*. Les aires mesurées des tissus ont été rapportées sur l'aire totale de la biopsie permettant d'évaluer la fraction de chaque tissu au sein de la biopsie. Les fractions de tissus au sein de la biopsie ont été évaluées en pourcentage comme il suit : *aire du tissu / aire totale de la biopsie*.

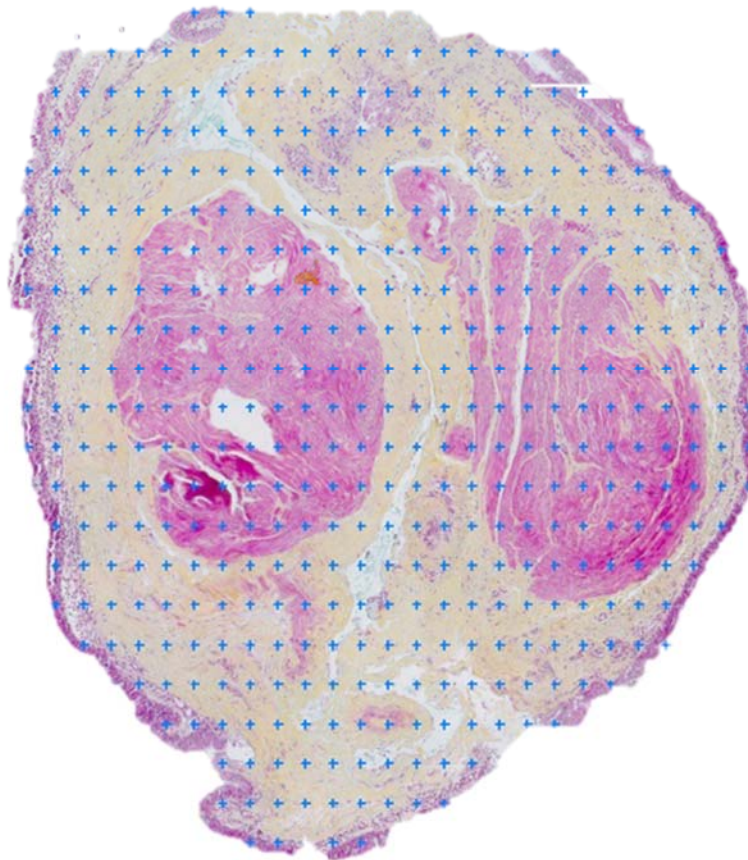


Figure 7. Évaluation de l'aire totale de la biopsie. Chaque croix bleue sur la biopsie représente une aire fixe.

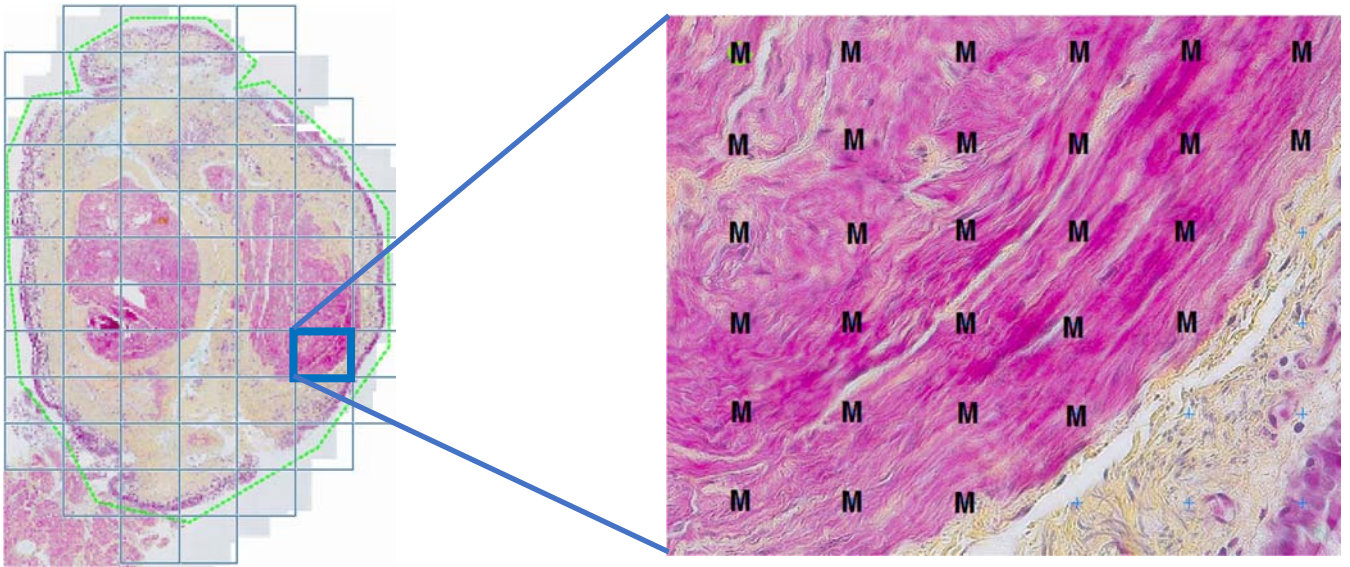


Figure 8. Évaluation de l'aire du muscle lisse dans une fraction de la biopsie. La biopsie à évaluer est limitée par une ligne verte et est fractionnée en carrés bleus. Chaque croix bleue identifiée M représente du tissu musculaire lisse.

De la même manière, nous avons évalué la fraction des structures au sein d'un tissu telle que, la fraction des cellules caliciformes au sein de l'épithélium, des fibres élastiques au sein de la matrice extracellulaire (lamina propria) et du collagène au sein du muscle lisse bronchique (permettant ainsi d'évaluer la fibrose musculaire ; figure 9). Par exemple, la fraction de collagène dans le muscle lisse, évaluée en pourcentage, a été calculée comme suit : *nombre de croix identifiées « collagène » / nombre de croix identifiées « muscle »*.

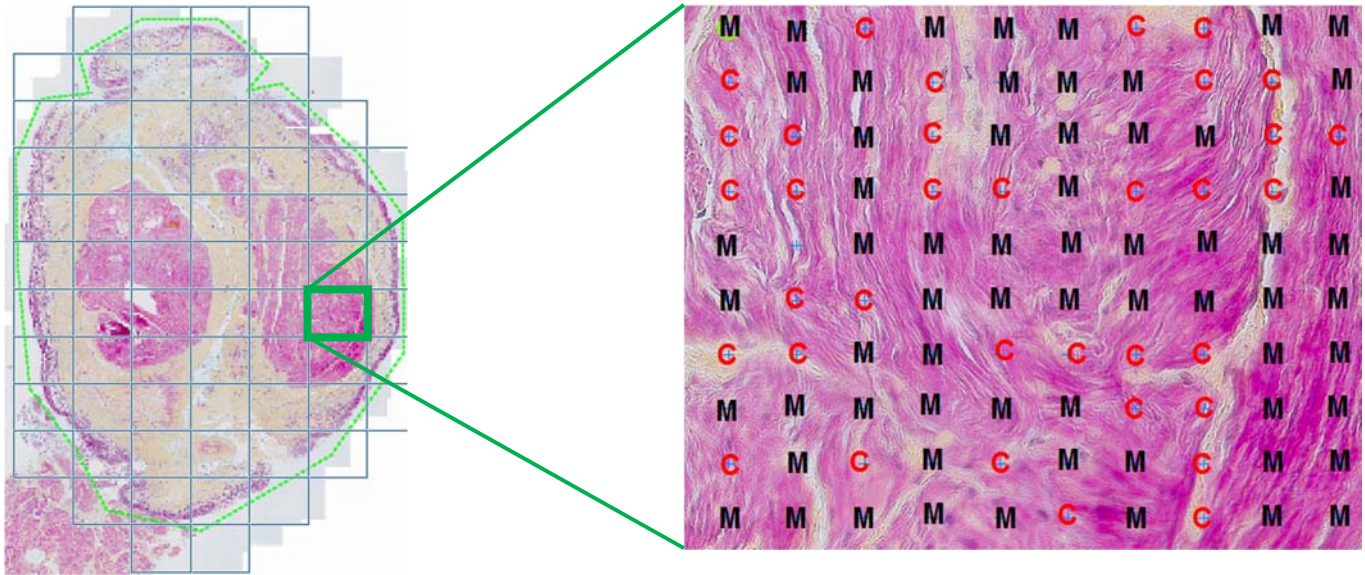


Figure 9. Évaluation de la fraction de matrice extracellulaire dans le muscle lisse dans une fraction de la biopsie. La biopsie à évaluer est limitée par une ligne verte et est fractionnée en carrés bleus. Chaque croix bleue identifiée M représente des fibres musculaires lisses et chaque croix identifiée C représente des fibres de collagène.

Si aucune biopsie colorée au MOVAT n'était exploitable, et que des biopsies colorées au HEPS et bleu alcian étaient disponibles, ces dernières colorations étaient utilisées pour évaluer l'aire totale de la biopsie, de la matrice extracellulaire (lamina propria), du muscle lisse et de l'épithélium uniquement.

## 4.2. ImageJ

Le logiciel ImageJ (version 1.48v et 1.50h ; NIH, Bethesda, MD, USA) nous a permis de mesurer la distance entre la membrane basale et le muscle lisse ( $\mu\text{m}$ ) (figure 10) évaluant l'épaisseur de la lamina propria, l'épaisseur de la membrane basale ( $\mu\text{m}$ ) et l'aire de l'épithélium corrigée par la longueur de la membrane basale ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ ) (figure 11) évaluant l'hyperplasie épithéliale. L'aire de d'épithélium corrigée a été mesurée sur des portions d'épithélium de bonne qualité, de coupe d'apparence transverse où la membrane basale et les cils à l'apex de l'épithélium étaient visibles, excluant ainsi les fragments de l'épithélium desquamés



mécaniquement ou physiologiquement. Ce paramètre a été calculée comme il suit : *aire de l'épithélium / longueur de la membrane basale correspondante*. Pour les précédentes mesures, une coupe perpendiculaire de la biopsie était indispensable. Un maximum de mesures a été réalisé pour chacune d'elles, la moyenne des mesures répétables a été utilisée pour la suite de l'étude.

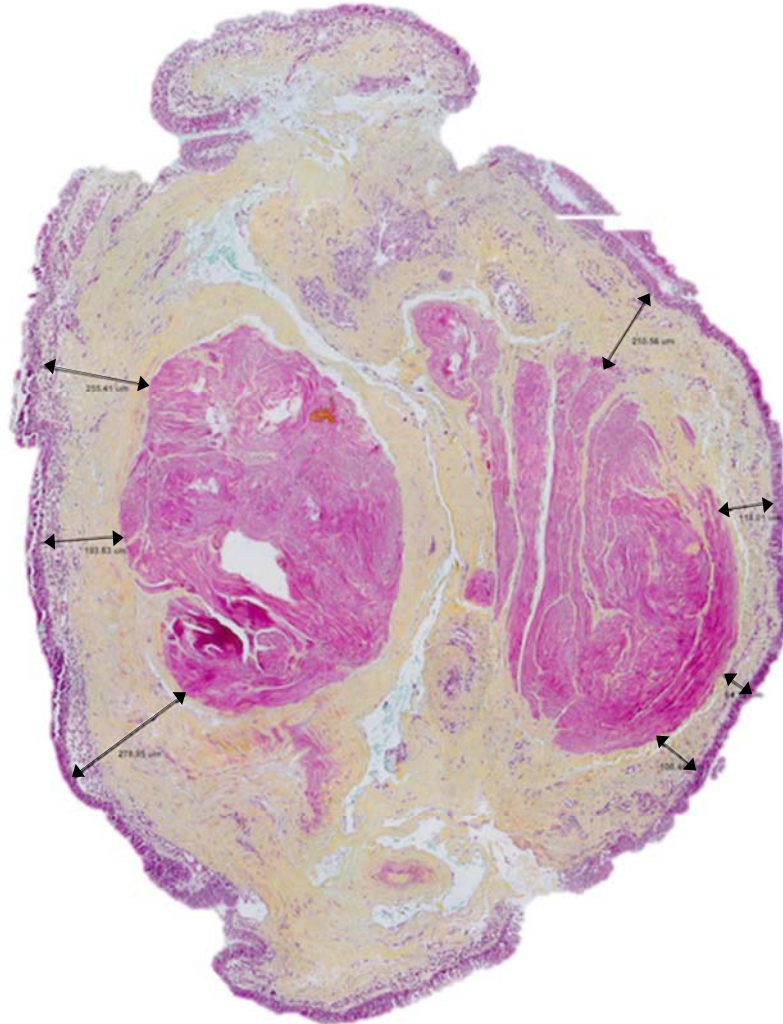


Figure 10. Mesure de la distance entre la membrane basale et le muscle lisse bronchique (µm).

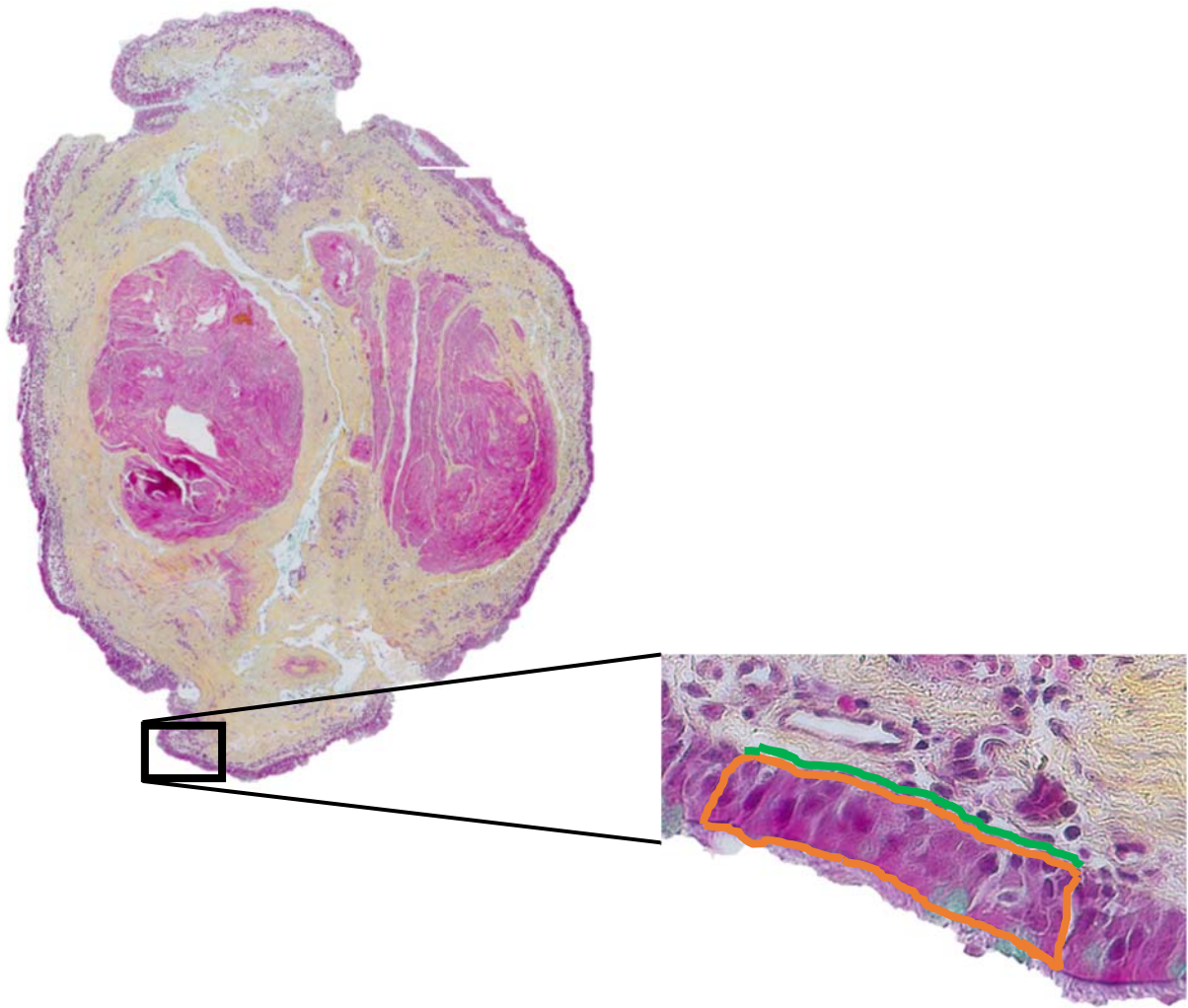


Figure 11. Mesure de l'aire de l'épithélium corrigée par la longueur de la membrane basale ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ ). Rectangle orange : aire de l'épithélium ; ligne verte : longueur de la membrane basale associée.

## 5. Score histologique semi-quantitatif

La lecture du score histologique semi-quantitatif a été réalisée par un pathologiste certifié, Dr Pierre Hélie. Une biopsie par cheval a été sélectionnée parmi celles présentant un score de qualité histologique supérieur ou égal à 3/5. Si la qualité de certaines biopsies était insuffisante pour établir un score, liées à des artefacts de coupe de l'épithélium ou à l'absence

de muscle par exemple, celles-ci étaient complétées par une deuxième biopsie du même cheval colorée au MOVAT (si existante). Si une seule biopsie colorée au MOVAT était disponible, mais ne permettait pas d'établir de manière complète le score, les biopsies préalablement colorées au HEPS et bleu alcian étaient utilisées en complément. Finalement un seul score est attribué pour chaque critère pour chaque cheval, même si deux biopsies ont été utilisées pour lire le score.

La fiabilité du score semi-quantitatif a été évaluée pour les critères mesurés par histomorphométrie, tels que, l'hyperplasie épithéliale, l'hyperplasie des cellules caliciformes, l'épaisseur de la membrane basale et la fibrose du muscle lisse. Lorsque les mesures histomorphométriques étaient réalisées sur deux biopsies pour un cheval, les mesures utilisées pour évaluer la fiabilité du score pour un critère étaient celles réalisées sur la biopsie ayant servi à établir le score de ce critère. En effet, pour cette évaluation, la moyenne des mesures histomorphométriques effectuées sur deux biopsies pour un cheval ne peut être utilisée.

## **6. Statistiques**

Les mesures obtenues par les méthodes histomorphométriques ou les résultats de cytologies du LBA ont été comparées entre les groupes des chevaux contrôles et asthmatiques à l'aide d'un test de t.

Les résultats des scores semi-quantitatif et du mucus trachéal ont été comparé entre les deux groupes à l'aide d'un test Mann-Whitney.

L'évaluation de la validité du score semi-quantitatif, lorsqu'appropriée, a été effectuée pour chaque critère du score, en comparant la mesure histomorphométrique obtenue, au score attribué pour chaque cheval à l'aide d'un test de t lorsque le critère était scoré sur 1 point (0-1/1) et à l'aide d'une analyse de la variance à une voie lorsque le critère était noté sur 2 points (0-1-2/2).

La corrélation de Pearson a été utilisée afin d'évaluer la corrélation entre les mesures histomorphométriques effectuées et des critères de l'anamnèse tels que la durée de la condition pour les chevaux asthmatiques, l'âge, l'inflammation pulmonaire. De plus, elle a permis



d'évaluer la corrélation entre les fractions de deux tissus occupés dans la biopsie. La corrélation de Spearman (non paramétrique) a permis d'évaluer une corrélation entre les scores semi-quantitatif et le score de mucus trachéal.

Le seuil significatif de 0,05 a été appliqué pour tous les tests réalisés. Lors d'absence de différence significative et lorsque p était proche de la valeur seuil (0,05), des calculs de taille d'échantillon nécessaire pour observer une différence significative et ce, 80 % du temps à un seuil de 0,05, ont été réalisés avec le logiciel G\*Power (version 3.1.9.2 ; Franz Faul, Universität Kiel, Germany). Des tests bilatéraux ont été utilisés, sauf quand la littérature permettait de prédire le sens de l'effet, tel que pour la comparaison entre les deux groupes de la distance entre la membrane basale et le muscle lisse, dans ce cas, un test unilatéral a été appliqué.

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel Prism (version 7.0b ; GraphPad Software Inc., La Jolla, California, USA).

# Résultats

## 1. Chevaux

Parmi les 24 chevaux contrôles, neuf chevaux présentaient une pathologie concomitante (ostéoarthrose (n = 3), syndrome naviculaire chronique (2), spondylomyélopathie cervicale (1), ténosynovite septique (1), desmite du ligament annulaire (1) et maladie du neurone moteur (1)), quatre chevaux présentaient une neutrophilie > 5% et pour un cheval, aucune biopsie n'a été prélevée. Finalement, 10 chevaux rencontraient les critères, établis précédemment, compatibles avec un statut sain et 22 biopsies mises en paraffine dans des cassettes histologiques ont été recensées. Un score de qualité histologique des biopsies endobronchiques colorées au MOVAT supérieur ou égale à 3/5 a permis de sélectionner 12 biopsies (soit en moyenne 1,2 biopsies par cheval, pour un score de qualité histologique moyen de 3,6/5). Le groupe de chevaux sains se compose comme il suit : cinq hongres et cinq juments, de race Quarter Horse (3), Paint (1), Oldenbourg (1), Belge (1), Morgan (1), Hanovrien (1), Appaloosa (1) et Croisé Thoroughbred (1), âgés de 5 à 20 ans (moyenne  $\pm$  écart-type de  $9,2 \pm 4,6$  ans). Quatre chevaux étaient gardés en stabulation et cinq au pâturage, le lieu de vie d'un cheval n'était pas rapporté. Tous les chevaux recevaient du foin dans leur alimentation.

Parmi les 34 chevaux présentés pour consultation respiratoire, neuf chevaux ont été diagnostiqués avec de l'asthme sévère, trois chevaux présentaient un lavage bronchoalvéolaire normal (neutrophiles < 5 %, mastocytes < 2 % et éosinophiles < 1 %) et deux chevaux, un lavage bronchoalvéolaire sévèrement inflammatoire et non compatible avec l'asthme léger/modéré (neutrophiles : 7,8 % et 41 %, mastocytes : 5,2 % et 1 %, éosinophiles : 15,8 % et 0 % respectivement). Finalement pour sept chevaux, aucune biopsie n'a été prélevée. Treize chevaux ont été diagnostiqués avec de l'asthme léger/modéré et 26 biopsies mises en paraffine dans des cassettes histologiques ont été recensées. Le score de qualité histologique de biopsies endobronchiques colorées au MOVAT a permis de conserver 14 biopsies de 11 chevaux parmi les 13 (soit en moyenne 1,3 biopsies par cheval, pour un score moyen de qualité de biopsie de 3,5/5). Deux biopsies colorées au MOVAT scorées à 2/5 ont été incluses pour deux chevaux ne possédant qu'une biopsie colorée au MOVAT avec un score  $\geq 3/5$ , afin de compléter les mesures

histomorphométriques ou le score semi-quantitatif par la suite. Pour deux chevaux, la qualité des biopsies colorées au MOVAT était insuffisante et une biopsie colorée au HEPS a alors été sélectionnée pour un cheval (les mesures réalisées sur cette coloration seront détaillées par la suite). Le cheval sans biopsie colorée au MOVAT ou au HEPS de bonne qualité a été exclu de l'étude. Le profil du groupe de chevaux asthmatiques légers/modérés est le suivant : six juments et six hongres, âgés de 2 à 11 ans (moyenne  $\pm$  écart type de  $7,1 \pm 3,3$  ans). Les chevaux sont de race Quarter Horse (4), Percheron (1), Oldenbourg (1), Dutch Warm Blood (1), Thoroughbred (1), Shire (1), Hanovrien (1), Canadien Warm Blood (1), Paint croisé Quarter Horse (1). Huit chevaux vivaient en stabulation et quatre chevaux au pâturage. Tous les chevaux recevaient du foin dans leur alimentation. Les signes cliniques sont apparus entre l'âge de 1 et 9 ans (moyenne  $\pm$  écart type de  $5,4 \pm 3,1$  ans). Les principaux signes cliniques sont de la toux à l'effort et/ou au repos pour neuf des 12 chevaux, en revanche, trois chevaux ne présentent pas de toux.

Les données des deux groupes sont appariées pour l'âge, et il n'existe pas de différence significative entre les deux groupes ( $p = 0,22$  ; figure 12).

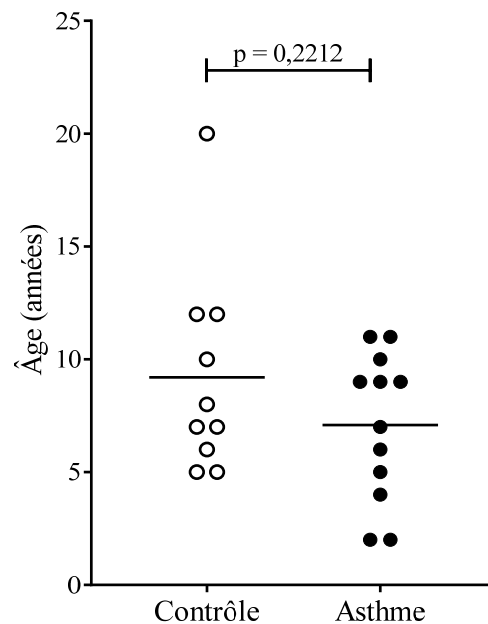


Figure 12. Répartition des âges des chevaux en fonction de statut contrôle et asthmatique. Ligne horizontale : moyenne.

Parmi les chevaux asthmatiques, sept chevaux présentaient une inflammation pulmonaire neutrophilique ( $\geq 5\%$ ), trois chevaux une inflammation pulmonaire mastocytaire ( $\geq 2\%$ ) et deux chevaux une inflammation pulmonaire mixte (neutrophiles et éosinophiles). Parmi les chevaux contrôles, deux présentaient une inflammation mastocytaire ( $> 2\%$ ). Dans l'annexe, l'analyse des chevaux contrôles excluant les chevaux avec une inflammation mastocytaire  $> 2\%$  a été réalisée. La neutrophilie pulmonaire des chevaux asthmatiques est significativement augmentée par rapport aux chevaux contrôles ( $p = 0,0004$ ), en revanche, les taux de mastocytes et d'éosinophiles pulmonaires sont similaires entre les deux groupes ( $p = 0,78$  et  $p = 0,70$  respectivement ; figure 13).

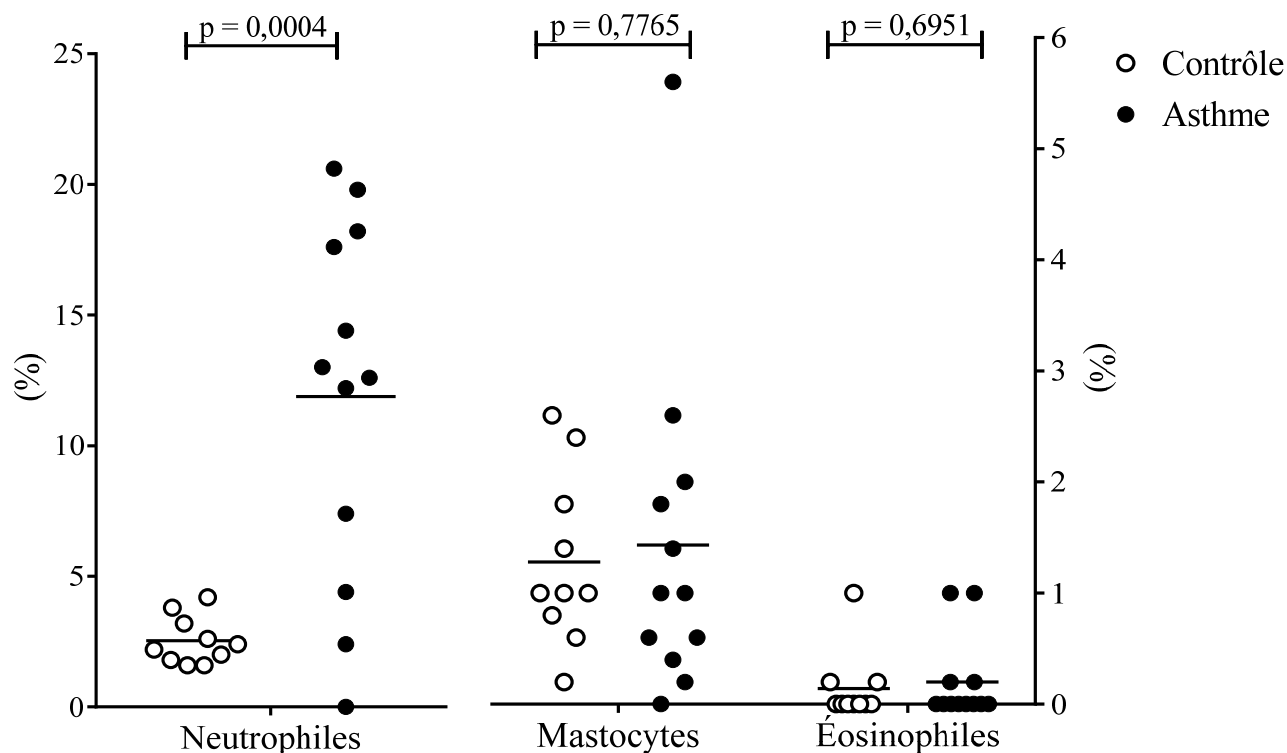


Figure 13. Profil inflammatoire des chevaux en fonction du statut contrôle et asthmatique. Ligne horizontale : moyenne.

Le score de mucus trachéal a été effectué lors de l'endoscopie des voies respiratoires inférieures sur tous les chevaux à l'exception de trois (deux chevaux sains et un asthmatique). Le score est augmenté de manière significative chez les chevaux asthmatiques ( $p = 0,004$  ;

figure 14) par rapport aux chevaux contrôles. Le score de mucus trachéal chez les chevaux asthmatiques varie de 0 à 4/5 et chez les chevaux contrôles de 0 à 1/5 avec une moyenne et un écart type respectivement de  $1,5 \pm 1/5$  et  $0,25 \pm 0,5/5$ . Un score supérieur ou égal à 1/5 permet d'identifier un cheval asthmatique avec une sensibilité de 91% et une spécificité de 75%.

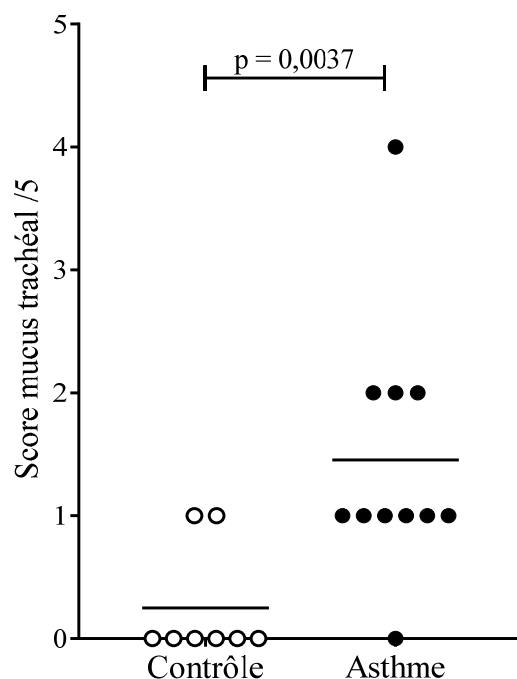


Figure 14. Score de mucus trachéal en fonction du statut contrôle et asthmatique. Ligne horizontale : moyenne.

## 2. Histomorphométrie

Les colorations HEPS effectuées antérieurement à l'étude ont été utilisées pour un cheval du groupe asthme. Cette coloration a permis d'effectuer les mesures suivantes : l'aire totale de la biopsie, les fractions de l'épithélium, du muscle lisse et de la matrice extracellulaire au sein de la biopsie, la distance entre la membrane basale et le muscle lisse, l'épaisseur de la membrane basale ainsi que l'aire de l'épithélium corrigée par la longueur de la membrane basale.

Les mesures de la distance entre la membrane basale et le muscle lisse, de l'épaisseur de la membrane basale ainsi que de l'aire de l'épithélium corrigée par la longueur de la membrane

basale ont été réalisée respectivement sur huit chevaux contrôles et 10 chevaux asthmatiques, à l'aide de 2 à 6 mesures par biopsie, soit en moyenne 4 mesures par cheval ; sur 10 chevaux contrôles et 11 chevaux asthmatiques à l'aide de 1 à 7 mesures par biopsies soit en moyenne 4,8 mesures par cheval; et sur l'ensemble des chevaux de l'étude, soit 10 chevaux contrôles et 12 asthmatiques à l'aide de 1 à 5 mesures par biopsie soit en moyenne 2,5 mesures par cheval.

L'aire totale des biopsies est similaire entre les deux groupes ( $p = 0,76$  ; figure 15) et varie de  $4,6 \times 10^5$  à  $2,9 \times 10^6 \mu\text{m}^2$  et de  $6,8 \times 10^5$  à  $3,1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$  chez les chevaux contrôles et les chevaux asthmatiques respectivement.

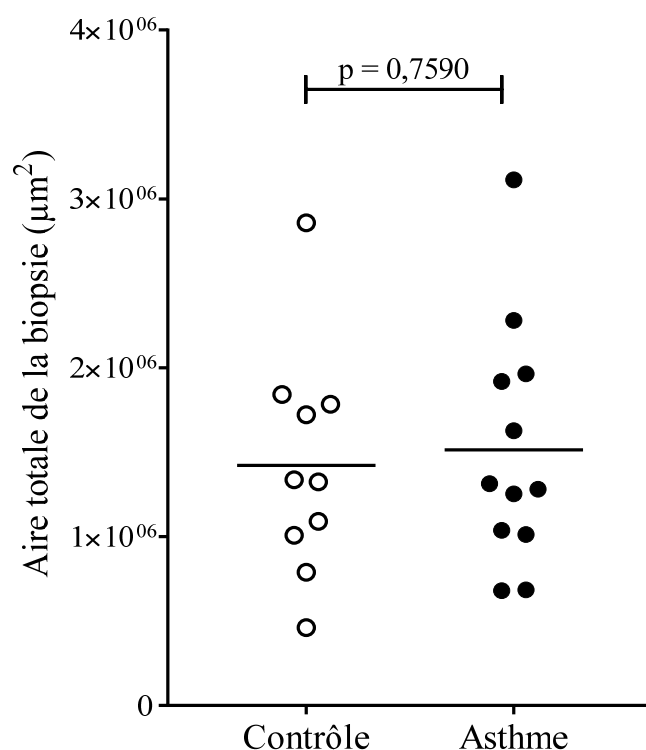


Figure 15. Évaluation de l'aire totale des biopsies en fonction du statut contrôle et asthmatique. Ligne horizontale : moyenne.

L'aire brute des différents tissus constituant la biopsie telle que l'aire de la matrice extracellulaire ( $p = 0,60$ ), de l'épithélium ( $p = 0,23$ ) et du muscle lisse bronchique ( $p = 0,65$ ) sont similaires entre les groupes (figure 16.A, B et C).

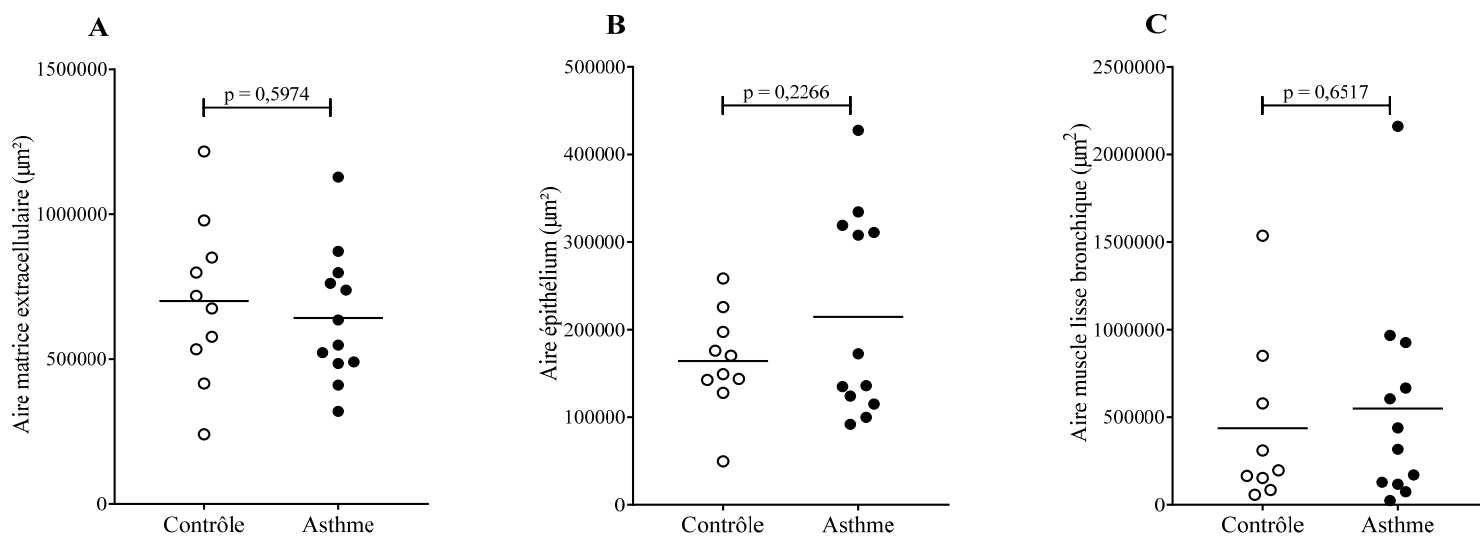


Figure 16. Évaluation de l'aire de la matrice extracellulaire (A), de l'épithélium (B) et du muscle lisse bronchique (C) en fonction du statut contrôle et asthmatique. Ligne horizontale : moyenne.

La distance entre la membrane basale et le muscle lisse bronchique, évaluant l'épaisseur de la lamina propria tend à être augmentée ( $p = 0,06$  test de t unilatéral ; figure 17) chez les chevaux asthmatiques ( $168 \pm 86 \mu\text{m}$ ) par rapport aux chevaux contrôles ( $108 \pm 56 \mu\text{m}$ ). Dix-neuf chevaux dans chaque groupe auraient été nécessaires pour mettre en évidence une différence significative au seuil de 0,05 et ce 80% du temps (test unilatéral).

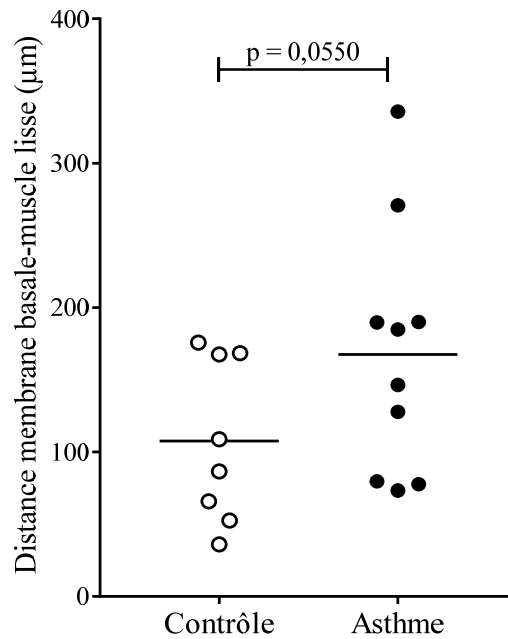


Figure 17. Évaluation de la distance entre la membrane basale et le muscle lisse bronchique en fonction du statut contrôle et asthmatique. Ligne horizontale : moyenne.

Chez les chevaux asthmatiques, la distance entre la membrane basale et le muscle lisse bronchique est positivement corrélée avec la fraction de matrice extracellulaire dans la biopsie ( $r = 0,84$  ;  $p = 0,002$  ; figure 18.B). En revanche cette corrélation est inexistante chez les chevaux du groupe contrôle ( $r = -0,41$  ;  $p = 0,32$  ; figure 18.A).



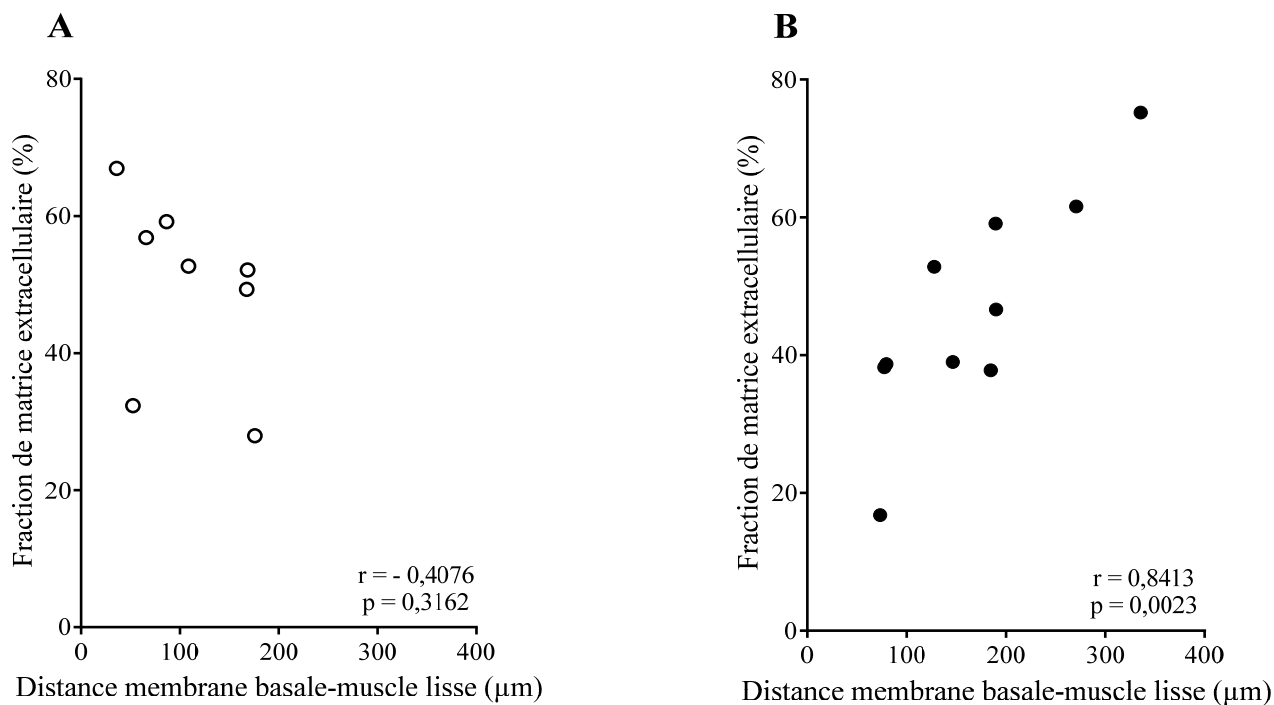


Figure 18. Évaluation de la corrélation entre la fraction de matrice extracellulaire et la distance membrane basale-muscle lisse bronchique chez les chevaux contrôles (**A**) et les chevaux asthmatiques (**B**).

La fraction de matrice extracellulaire dans la biopsie chez les chevaux contrôles et asthmatiques représente respectivement  $51,5 \pm 12,5 \%$  et  $46,9 \pm 15,3 \%$  (figure 27). De la même manière que pour l'aire brute de la matrice extracellulaire, la fraction de cette structure au sein de la biopsie ne permet pas de différencier de manière significative les deux groupes ( $p = 0,46$  ; figure 19). De la même manière, la fraction de fibres élastiques chez les chevaux contrôles et asthmatiques représente respectivement  $18,6 \pm 8,8 \%$  et  $18,1 \pm 6,9 \%$  et ne permet pas de différencier les deux groupes ( $p = 0,89$  ; figure 20).

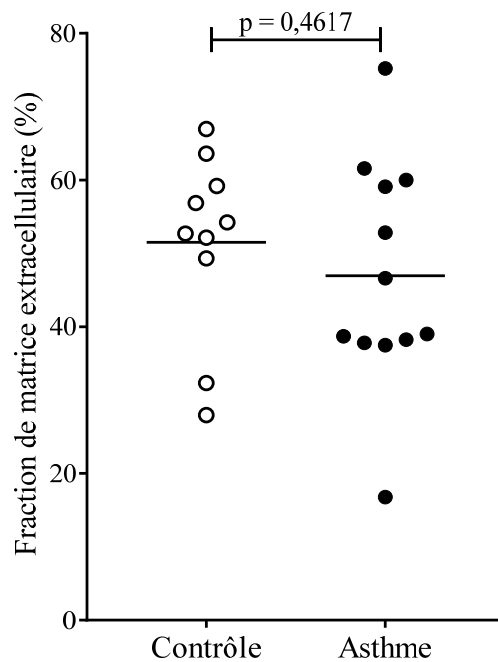


Figure 19. Évaluation de la fraction de matrice extracellulaire dans la biopsie en fonction du statut contrôle et asthmatique. Ligne horizontale : moyenne.

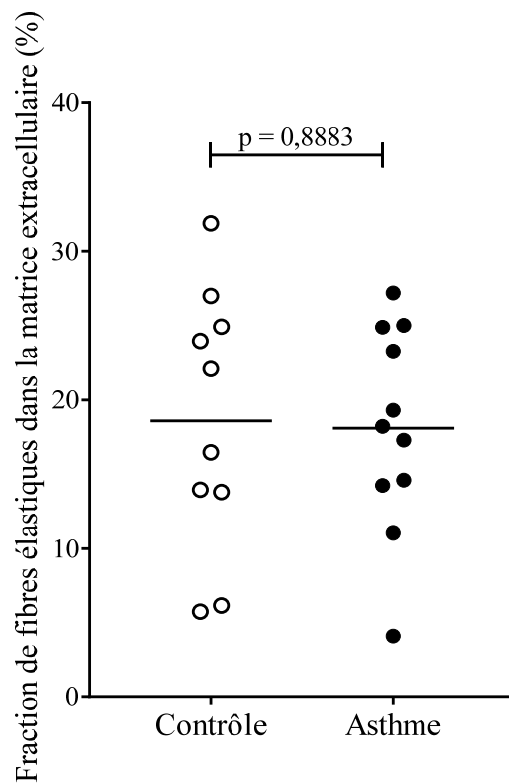


Figure 20. Évaluation de la fraction de fibres élastiques dans la matrice extracellulaire en fonction du statut contrôle et asthmatique. Ligne horizontale : moyenne.

La fraction de fibres élastiques dans la matrice extracellulaire chez les chevaux contrôles est corrélée négativement avec l'âge des animaux ( $r = -0,67$  ;  $p = 0,03$  ; figure 21.A). En revanche, chez les chevaux asthmatiques aucune corrélation n'a été mise en évidence ( $r = 0,12$  ;  $p = 0,72$  ; figure 21.B).

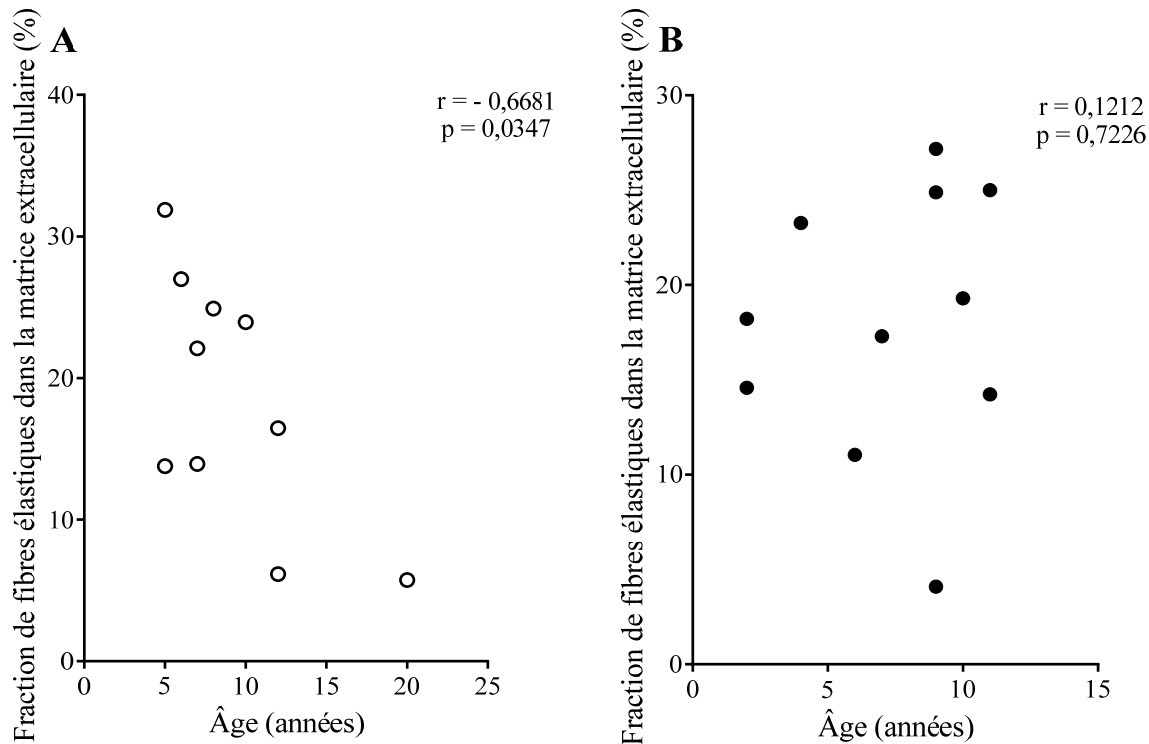


Figure 21. Évaluation de la corrélation entre la fraction de fibres élastiques dans la matrice extracellulaire et l'âge des chevaux contrôles (A) et des chevaux asthmatiques (B).

La fraction de l'épithélium dans la biopsie chez les chevaux contrôles et asthmatiques représente respectivement  $12,2 \pm 4,8$  % et  $15,7 \pm 7,6$  % (figure 27). De la même manière que pour l'aire de l'épithélium brute, la fraction de l'épithélium dans la biopsie ne permet pas de différencier de manière significative les deux groupes ( $p = 0,23$  ; figure 22).

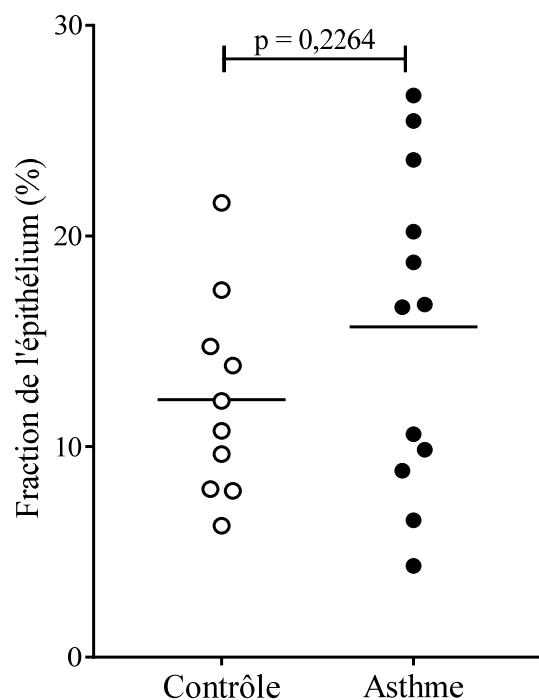


Figure 22. Évaluation de la fraction de l'épithélium dans la biopsie en fonction du statut contrôle et asthmatique. Ligne horizontale : moyenne.

L'aire de l'épithélium corrigée par la longueur de la membrane basale, évaluant l'hyperplasie épithéliale est augmentée bien que de manière non significative chez les chevaux asthmatiques par rapport aux chevaux contrôles ( $p = 0,06$  ; figure 23), suggérant ainsi une hyperplasie épithéliale dans le groupe de chevaux asthmatiques. Vingt-deux chevaux dans chaque groupe auraient été nécessaires pour mettre en évidence une différence significative au seuil de 0,05 et ce 80% du temps.

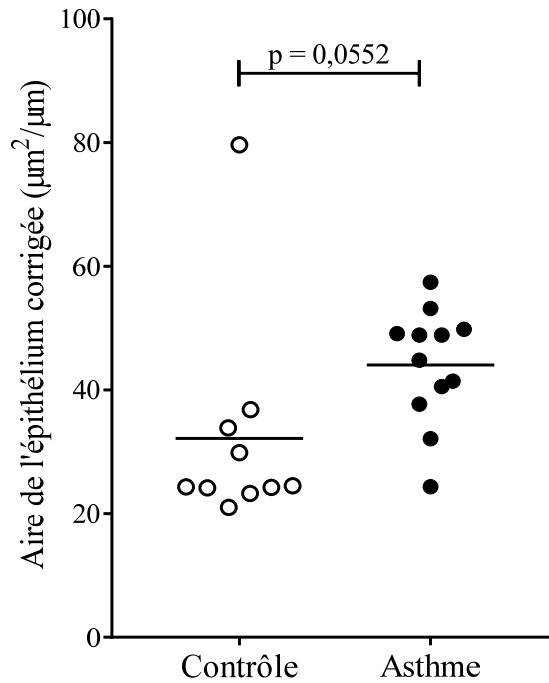


Figure 23. Aire de l'épithélium corrigée par la longueur de la membrane basale ( $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ ) en fonction du statut contrôle et asthmatique. Ligne horizontale : moyenne.

De plus, l'aire de l'épithélium corrigée par la longueur de la membrane basale est positivement corrélée avec la neutrophilie pulmonaire chez les chevaux asthmatiques ( $r = 0,59$  ;  $p = 0,04$  ; figure 24.B), alors que cette corrélation est inexistante chez les chevaux contrôles ( $r = -0,49$  ;  $p = 0,15$  ; figure 24.A).

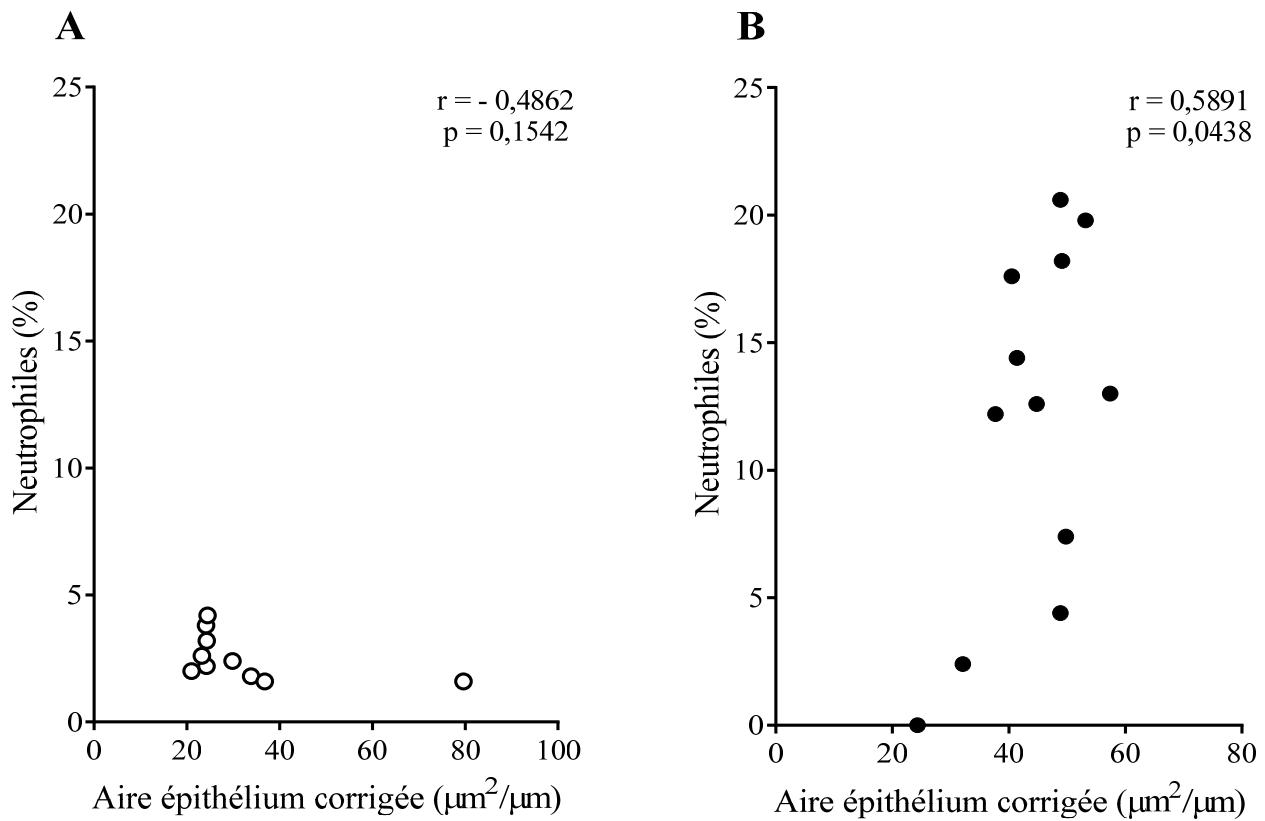
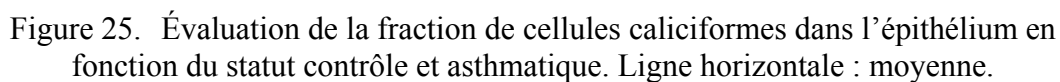


Figure 24. Évaluation de la corrélation entre la neutrophilie pulmonaire et l'aire de l'épithélium corrigée par la longueur de la membrane basale chez les chevaux contrôles (**A**) et les chevaux asthmatiques (**B**).

La fraction de cellules caliciformes dans l'épithélium est augmentée de manière non significative chez les chevaux sains par rapport aux chevaux asthmatiques ( $p = 0,09$  ; figure 25). Vingt-quatre chevaux dans chaque groupe auraient été nécessaires pour mettre en évidence une différence significative au seuil de 0,05 et ce 80 % du temps.



57

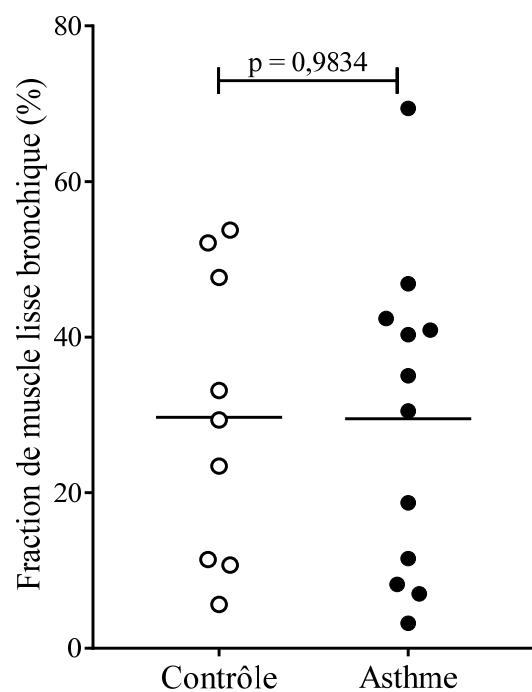


Figure 26. Évaluation de la fraction de muscle lisse dans la biopsie en fonction du statut contrôle et asthmatique. Ligne horizontale : moyenne.

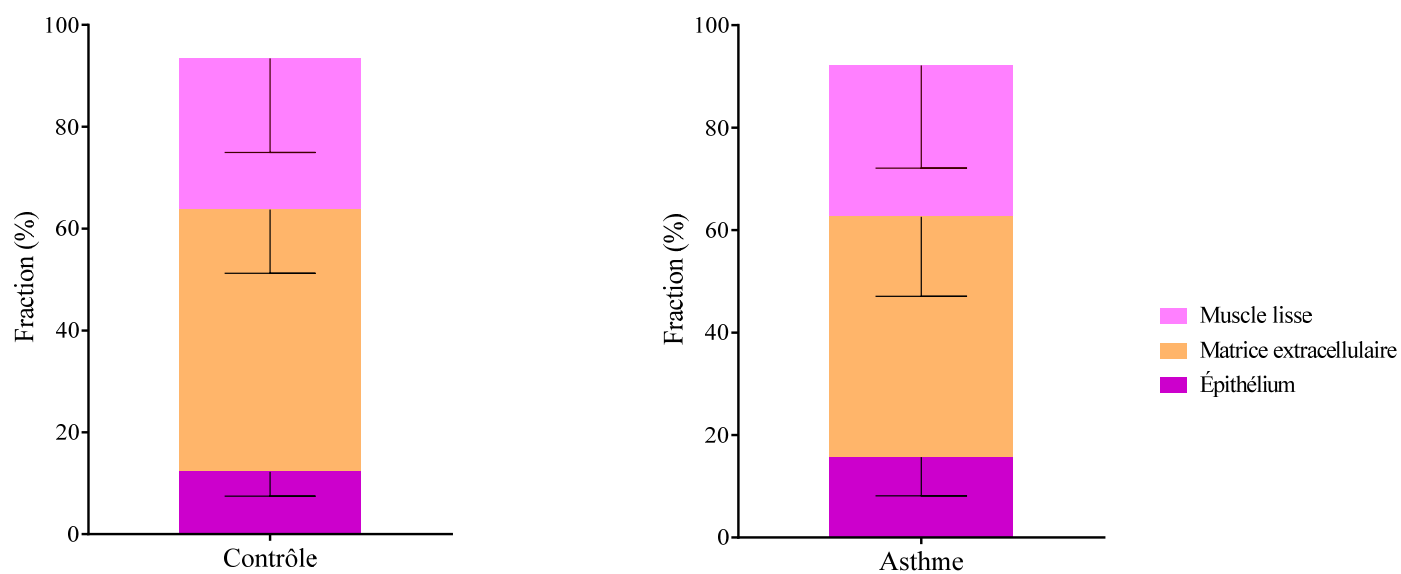


Figure 27. Répartition des fractions de tissus dans la biopsie endobronchique chez les chevaux contrôles et asthmatiques. Ligne horizontale : écart type.



La fraction de matrice extracellulaire dans le muscle lisse représente chez les chevaux contrôles et asthmatiques respectivement,  $39,4 \pm 10,4 \%$  et  $47,1 \pm 14 \%$  et ne permet pas de différencier de manière significative les deux groupes ( $p = 0,19$  ; figure 28).

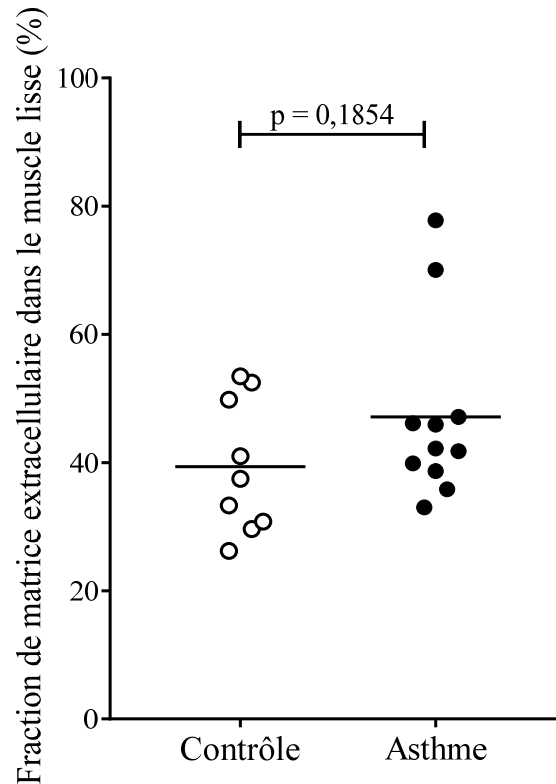


Figure 28. Évaluation de la fraction de matrice extracellulaire dans le muscle lisse en fonction du statut contrôle et asthmatique. Ligne horizontale : moyenne.

Aucune corrélation entre la fibrose musculaire et la neutrophilie n'a été mise en évidence ni chez les chevaux contrôles ( $r = 0,36$  ;  $p = 0,34$  ; figure 29.A) ni chez les chevaux asthmatiques ( $r = 0,29$  ;  $p = 0,39$  ; figure 29.B).

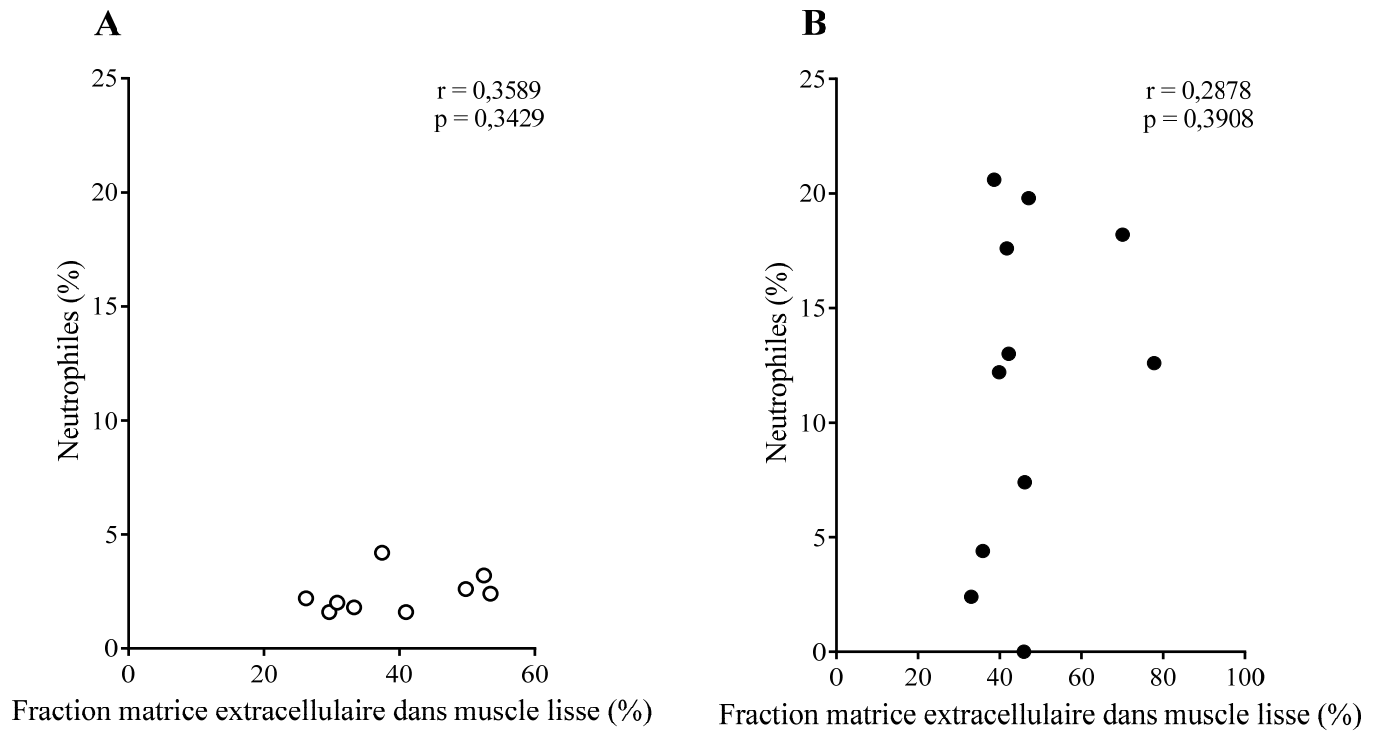


Figure 29. Évaluation de la corrélation entre la neutrophilie pulmonaire et la fraction de matrice extracellulaire dans le muscle lisse chez les chevaux contrôles (**A**) et les chevaux asthmatiques (**B**).

L'épaisseur de la membrane basale chez les chevaux contrôles et asthmatiques mesure respectivement  $4,4 \pm 1,3 \mu\text{m}$  et  $4,7 \pm 1,6 \mu\text{m}$  et ne permet pas de différencier les deux groupes ( $p = 0,68$  ; figure 30).

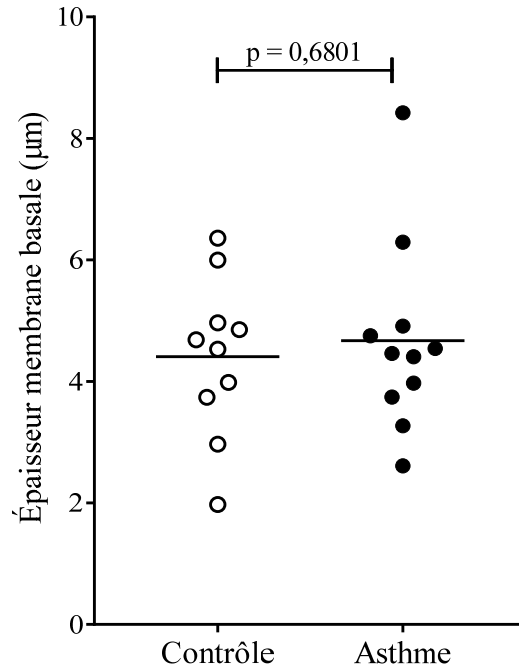


Figure 30. Évaluation de l'épaisseur de la membrane basale en fonction du statut contrôle et asthmatique. Ligne horizontale : moyenne.

L'inflammation mastocytaire tend à corrélérer négativement avec l'aire de l'épithélium corrigée chez les chevaux asthmatiques ( $r = -0,49$  ;  $p = 0,11$ ), en revanche, aucune corrélation n'est mise en évidence chez les chevaux contrôles ( $r = 0,04$  ;  $p = 0,91$ ). De plus, elle tend à corrélérer positivement avec la fraction de matrice extracellulaire dans le muscle lisse, chez les chevaux contrôles ( $r = 0,60$  ;  $p = 0,09$  ; figure 31.A) et négativement chez les chevaux asthmatiques ( $r = -0,57$  ;  $p = 0,06$  ; figure 31.B).

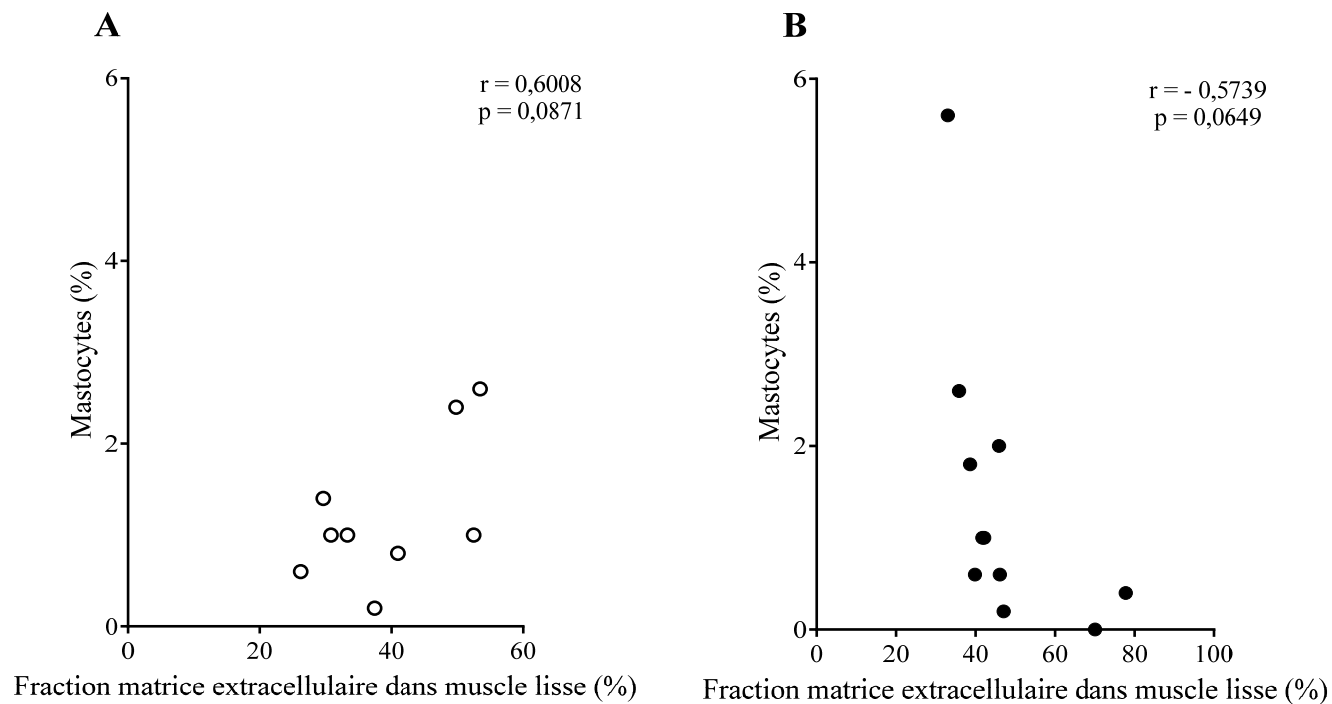


Figure 31. Évaluation de la corrélation entre l'inflammation mastocytaire pulmonaire et la fraction de matrice extracellulaire dans le muscle lisse chez les chevaux contrôles (**A**) et les chevaux asthmatiques (**B**).

<b>Structures évaluées</b>	<b>Test de t Valeur de p</b>	<b>Direction de l'effet</b>
Aire épithélium corrigée par membrane basale	0,06 $\Delta$	Asthme > Contrôle
Distance membrane basale – muscle lisse	0,06 $\Delta \Psi$	Asthme > Contrôle
Fraction cellules caliciformes dans épithélium	0,09 $\Delta$	Contrôle > Asthme
Aire totale biopsie	0,76	
Aire brute matrice extracellulaire	0,60	
Aire brute épithélium	0,23	
Aire brute muscle lisse bronchique	0,65	
Fraction matrice extracellulaire dans biopsie	0,46	
Fraction fibres élastiques dans matrice extracellulaire	0,89	
Fraction épithélium dans biopsie	0,23	
Fraction muscle lisse bronchique dans biopsie	0,98	
Fraction matrice extracellulaire dans muscle lisse	0,19	
Épaisseur membrane basale	0,68	

Tableau I. Tableau récapitulatif des différences histomorphométriques entre les groupes.  
 $\Delta$  tendance à une différence significative ( $p \leq 0,1$ ) ;  $\Psi$  test de t unilatéral.

Corrélation évaluée (critère / critère)	Test de Pearson (r ; p)	Statut
Distance membrane basale - muscle lisse / fraction de matrice extracellulaire	0,84 ; 0,002 *	Asthme
Aire épithélium corrigée par membrane basale / neutrophiles pulmonaires	0,59 ; 0,04 *	Asthme
Fraction fibres élastiques dans matrice extracellulaire / âge	-0,67 ; 0,03 *	Contrôle
Fraction de matrice extracellulaire dans muscle lisse / mastocytes pulmonaires	-0,57 ; 0,06 Δ	Asthme
Fraction de matrice extracellulaire dans muscle lisse / mastocytes pulmonaires	0,60 ; 0,09 Δ	Contrôle
Aire épithélium corrigée par membrane basale / mastocytes pulmonaires	-0,49 ; 0,1 Δ	Asthme
Distance membrane basale - muscle lisse / fraction de matrice extracellulaire	-0,41 ; 0,32	Contrôle
Fraction fibres élastiques dans matrice extracellulaire / âge	0,12 ; 0,72	Asthme
Aire épithélium corrigée par membrane basale / neutrophiles pulmonaires	-0,49 ; 0,15	Contrôle
Matrice extracellulaire dans muscle lisse / neutrophiles pulmonaires	0,36 ; 0,34	Contrôle
Matrice extracellulaire dans muscle lisse / neutrophiles pulmonaires	0,29 ; 0,39	Asthme
Aire épithélium corrigée par membrane basale / mastocytes pulmonaires	0,04 ; 0,91	Contrôle

Tableau II. Tableau récapitulatif des corrélations entre les différents critères évalués.

\* différence significative ( $p < 0,05$ ) ; Δ tendance à une différence significative ( $p \leq 0,1$ ).

### **3. Score histologique semi-quantitatif**

Le score semi-quantitatif a été lu sur les biopsies endobronchiques des 22 chevaux de l'étude. Le score de 13 chevaux (six asthmatiques et sept contrôles) a été évalué sur une seule biopsie colorée au MOVAT, et celui de sept chevaux (cinq asthmatiques et deux contrôles), sur deux biopsies colorées au MOVAT (principalement en raison de la qualité insuffisante pour l'évaluation de certains critères malgré un score de qualité histologique  $\geq 3/5$ ). La lecture du score d'un cheval sain effectuée sur une biopsie colorée au MOVAT a été complétée par les lames colorées au HEPS et bleu alcian. Finalement le score d'un cheval asthmatique a été lu uniquement sur les colorations HEPS et bleu alcian.

Le score total des chevaux contrôles s'étendait de 3 à 7/14 avec une moyenne et un écart type de  $4,6 \pm 1,3/14$  et celui des chevaux asthmatiques oscillait entre 4 et 10/14 avec une moyenne et un écart type de  $6,8 \pm 1,9/14$ . Le score semi-quantitatif total est augmenté de manière significative chez les chevaux asthmatiques par rapport aux chevaux contrôles ( $p = 0,005$  ; figure 32). Un score total  $> 5/14$  permet d'identifier un cheval asthmatique avec une sensibilité 75 % et une spécificité de 80 %. Cette significativité est associée à deux critères : l'infiltration de cellules inflammatoires dans la matrice extracellulaire (/1) et l'hyperplasie épithéliale (/2).

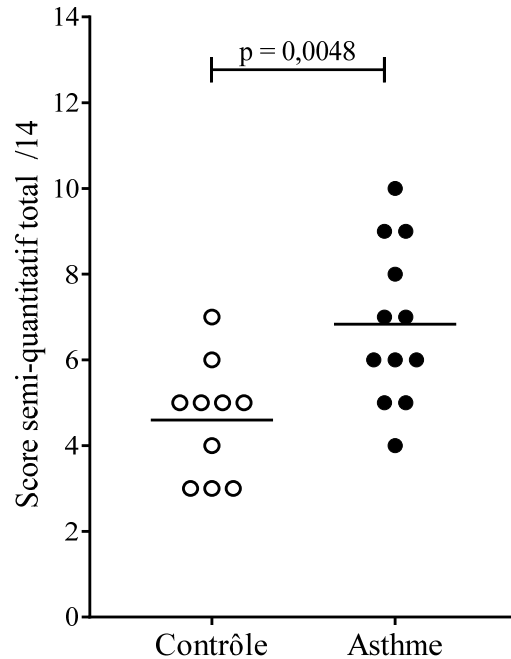


Figure 32. Score semi-quantitatif total (/14) en fonction du statut contrôle et asthmatique. Ligne horizontale : moyenne.

Chez les chevaux asthmatiques légers/modérés, le score semi-quantitatif total tend à corrélér positivement avec l'inflammation pulmonaire neutrophilique ( $r = 0,57$  ;  $p = 0,05$  ; figure 33.B.). En revanche chez les chevaux contrôles, aucune corrélation n'est mise en évidence ( $r = -0,33$  ;  $p = 0,356$  ; figure 33.A.). La neutrophilie pulmonaire est significativement augmentée chez les chevaux asthmatiques qui présentent un score d'hyperplasie épithéliale augmenté (1/1) par rapport à ceux qui ne présentent pas d'hyperplasie épithéliale ( $p = 0,047$  ; figure 34). Un seul cheval avec un score d'hyperplasie épithéliale augmenté ne permet pas d'évaluer statistiquement l'association entre ces deux paramètres. L'association entre la neutrophilie pulmonaire et, les scores d'hyperplasie des cellules caliciformes, des glandes à mucus dans le muscle lisse et de la fibrose du muscle lisse n'est pas évaluable statistiquement en raison du faible nombre de chevaux pour certaines valeurs du score. Il n'existe aucune association entre l'inflammation pulmonaire neutrophilique et les scores d'infiltration cellulaire dans la lamina propria ou l'épithélium, de l'épaisseur de la membrane basale ni des glandes à mucus dans la lamina propria.



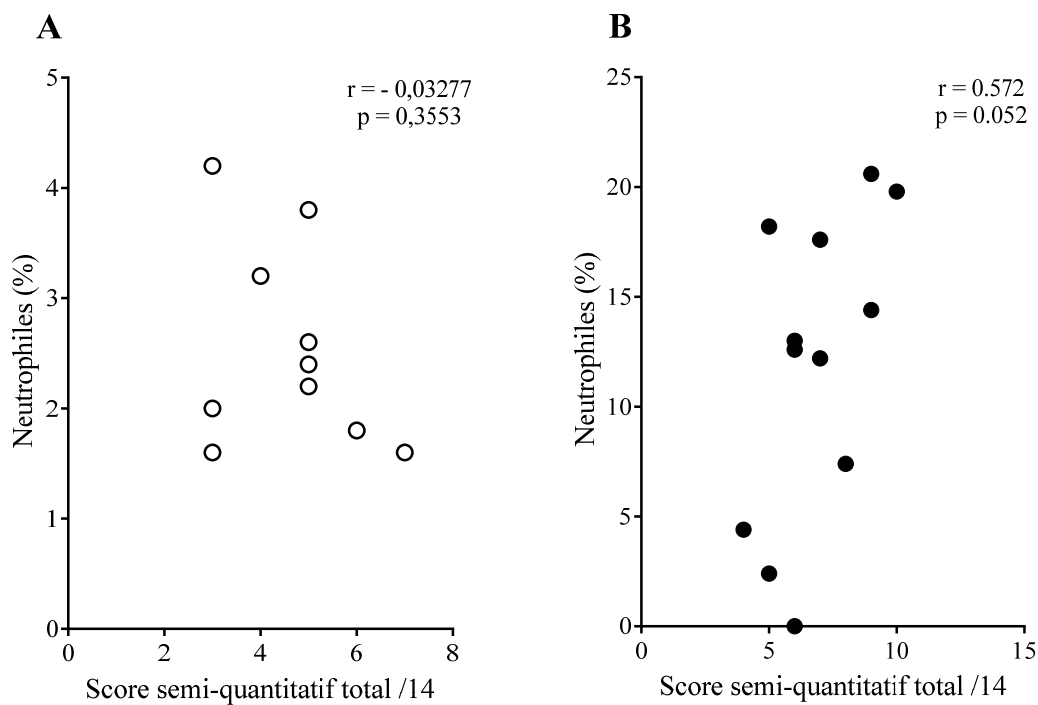


Figure 33. Évaluation de la corrélation entre la neutrophilie pulmonaire et le score semi-quantitatif total (/14) chez les chevaux contrôles (A) et les chevaux asthmatiques (B).

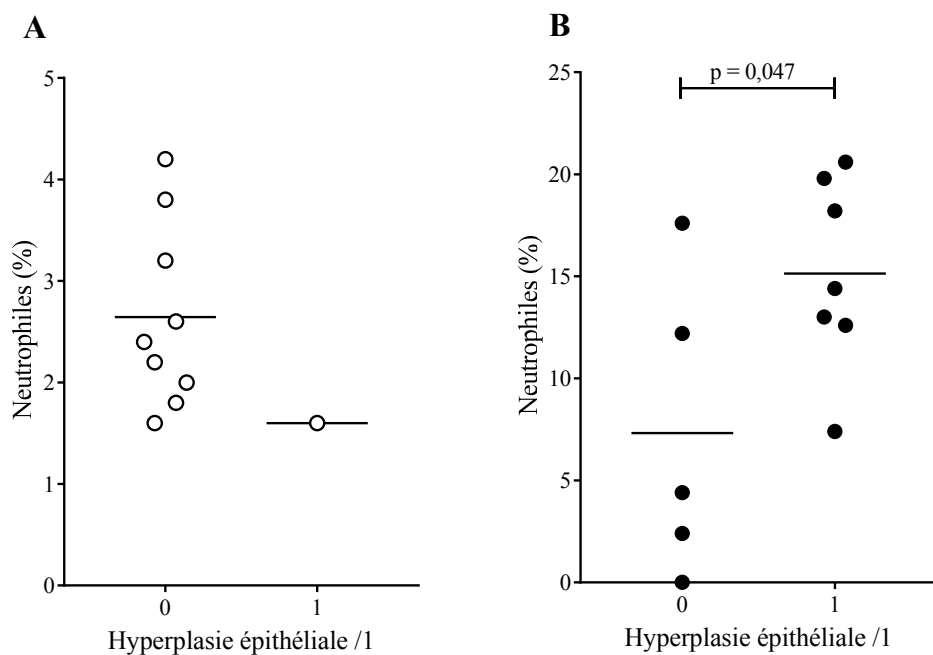


Figure 34. Évaluation de la corrélation entre la neutrophilie pulmonaire et le score d'hyperplasie épithéliale (/1) chez les chevaux contrôles (A) et les chevaux asthmatiques (B). Ligne horizontale : moyenne.

Le score d'infiltration de cellules inflammatoires dans la matrice extracellulaire varie de 0 à 1/2 avec une moyenne et un écart type de  $0,5 \pm 0,5/2$  chez les chevaux contrôles et de 0 à 2/2 avec une moyenne et un écart type de  $1,3 \pm 0,7/2$  chez les chevaux asthmatiques. Ce score est augmenté de manière significative chez les chevaux asthmatiques par rapport aux chevaux contrôles ( $p = 0,007$  ; figure 35) et un score  $\geq 1/2$  permet d'identifier un cheval asthmatique avec une sensibilité de 92 % et une spécificité de 50 %.

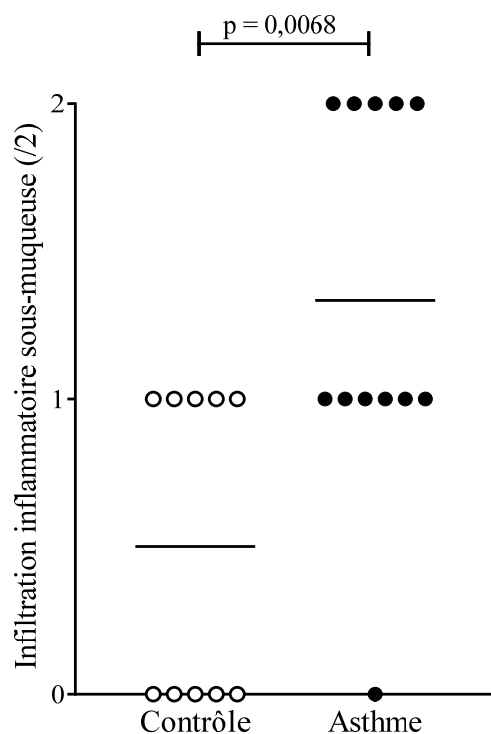


Figure 35. Score semi-quantitatif : Infiltration de cellules inflammatoires dans la sous-muqueuse (/2) en fonction du statut contrôle et asthmatique. Ligne horizontale : moyenne.

Le score d'hyperplasie épithéliale varie de 0 à 1/1 avec une moyenne et un écart type de  $0,1 \pm 0,3/1$  de  $0,6 \pm 0,5/1$  chez les chevaux contrôles et asthmatiques respectivement. Ce score est augmenté de manière significative chez les chevaux asthmatiques par rapport aux chevaux contrôles ( $p = 0,03$  ; figure 36) et un score de 1/1 permet d'identifier un cheval asthmatique avec

une sensibilité de 58 % et une spécificité de 90 %. En effet, comme montré précédemment, certains chevaux asthmatiques ne présentent pas d'hyperplasie épithéliale.

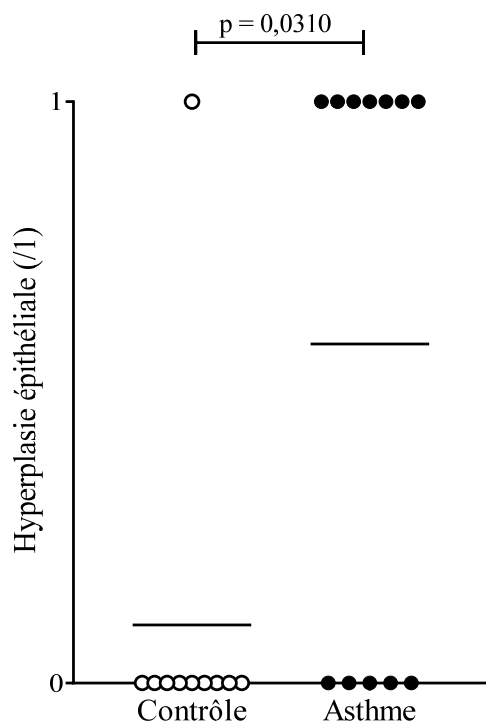


Figure 36. Score semi-quantitatif : Hyperplasie épithéliale (/1) en fonction du statut contrôle et asthmatique. Ligne horizontale : moyenne.

Ce nouveau score, mis en place à partir des deux critères significatifs précédemment cités (infiltration de cellules inflammatoires dans la matrice extracellulaire et hyperplasie épithéliale), varie de 0 à 1/3 avec une moyenne et un écart type de  $0,6 \pm 0,5/3$  chez les chevaux contrôles et de 0 à 3/3 avec une moyenne et un écart type de  $1,9 \pm 0,9/3$  chez les chevaux asthmatiques. L'utilisation de ces deux critères significatifs dans l'évaluation semi-quantitative du remodelage des voies respiratoires centrales permet de mettre en évidence un score significativement augmenté chez les chevaux asthmatiques ( $p = 0,0006$  ; figure 37). Un score  $> 1/3$  permet d'identifier un cheval asthmatique avec une sensibilité de 75 % et une spécificité de 100 %.

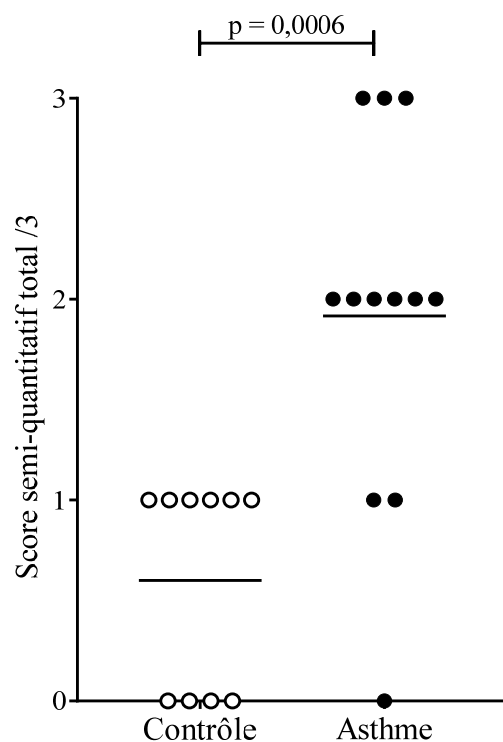


Figure 37. Nouveau score semi-quantitatif (/3) en fonction du statut contrôle et asthmatique. Ligne horizontale : moyenne.

Bien qu'il n'existe pas de différence significative entre les deux groupes concernant le score de glande à mucus ni dans la sous-muqueuse ( $p = 0,62$ ) ni dans le muscle lisse bronchique ( $p = 0,48$ ), le score semble augmenté dans un premier temps dans la matrice extracellulaire puis dans un deuxième temps dans le muscle lisse. En effet, chez tous les chevaux qui présentaient un score de glande à mucus total (matrice extracellulaire et muscle lisse) de 1/2, ce score était associé à une augmentation des glandes à mucus dans la matrice extracellulaire ( $n = 15$ , huit chevaux dans le groupe asthme et sept dans le groupe contrôle). Un score de glande à mucus de 1/1 dans le muscle lisse était observé uniquement chez des chevaux présentant déjà un score de glande à mucus augmenté dans la matrice extracellulaire ( $n = 2$ , chevaux asthmatiques).

Paramètres évalués	Test de t (Mann-Whitney) Valeur de p	Direction de l'effet
<b>Épithélium</b>		
Hyperplasie épithéliale	0,0310 *	Asthme > Contrôle
Infiltration inflammatoire (épithélium)	0,1358	Asthme > Contrôle
Hyperplasie cellules caliciformes	0,1948	
Desquamation	0,9891	
<b>Matrice extracellulaire</b>		
Épaisseur membrane basale	> 0,9999	
Infiltration inflammatoire (sous muqueuse)	0,0068 *	Asthme > Contrôle
Glandes à mucus	0,6241	
<b>Muscle lisse bronchique</b>		
Fibrose	0,8085	
Glande à mucus	0,4805	
Fin du muscle visible	0,3476	

Tableau III. Tableau récapitulatif des différences entre les groupes pour les critères individuels du score semi-quantitatif. \* différence significative ( $p < 0,05$ ).

## **4. Associations entre les mesures histomorphométriques et le score histologique semi-quantitatif**

Les chevaux asthmatiques qui présentent une aire d'épithélium corrigée importante, sont également caractérisés par un score d'hyperplasie épithéliale significativement plus important ( $p = 0,008$  ; figure 38.B). La limite entre les deux scores d'hyperplasie épithéliale est proche de  $41 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ . Les chevaux contrôles sont moins nombreux à être identifiés avec un score de 1/1, tel qu'un seul cheval ne nous permet pas l'effectuer d'analyses statistiques. Cependant, le cheval identifié avec un score d'hyperplasie épithéliale de 1/1 présente une aire d'épithélium corrigée supérieure à  $41 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}$  (figure 38.A). De plus, les chevaux contrôles identifiés avec un score de 0/1 présentent une aire d'épithélium corrigée inférieure à ce seuil. Par conséquent, l'hyperplasie épithéliale, évaluée par la mesure de l'aire de l'épithélium corrigée par la longueur de la membrane basale est représentée de manière fiable par le score d'hyperplasie épithéliale, dans les deux groupes.

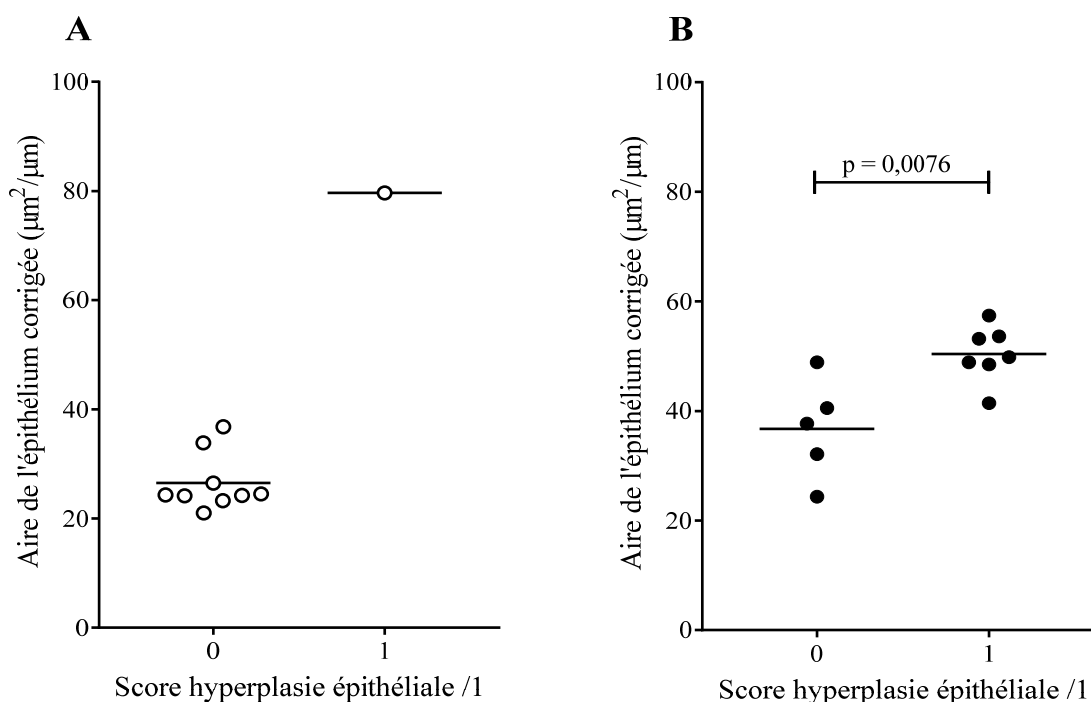


Figure 38. Évaluation de l'association entre l'aire de l'épithélium corrigée par la longueur de la membrane basale et le score d'hyperplasie épithéliale chez les chevaux contrôles (A) et les chevaux asthmatiques (B). Ligne horizontale : moyenne.

La fraction de matrice extracellulaire dans le muscle lisse, évaluant la fibrose musculaire, chez les chevaux asthmatiques qui présentent une hyperplasie épithéliale (1/1) représente  $53,7 \pm 16,2$  % (figure 40) et est augmentée de manière non significative ( $p = 0,09$  ; figure 39.B) par rapport aux chevaux asthmatiques qui ne présentent pas d'hyperplasie épithéliale (0/1). Chez ces derniers, la fraction de matrice extracellulaire dans le muscle lisse représente  $40,3 \pm 9,5$  % (figure 40). Vingt chevaux asthmatiques, soit 10 chevaux pour chaque score d'hyperplasie épithéliale auraient été nécessaires pour mettre en évidence une différence significative au seuil de 0,05 et ce 80 % du temps. Un seul cheval contrôle avec un score d'hyperplasie épithéliale de 1/1 ne nous permet pas d'analyser statistiquement l'association entre l'hyperplasie épithéliale et la fraction de matrice extracellulaire dans le muscle lisse (figure 39.A).

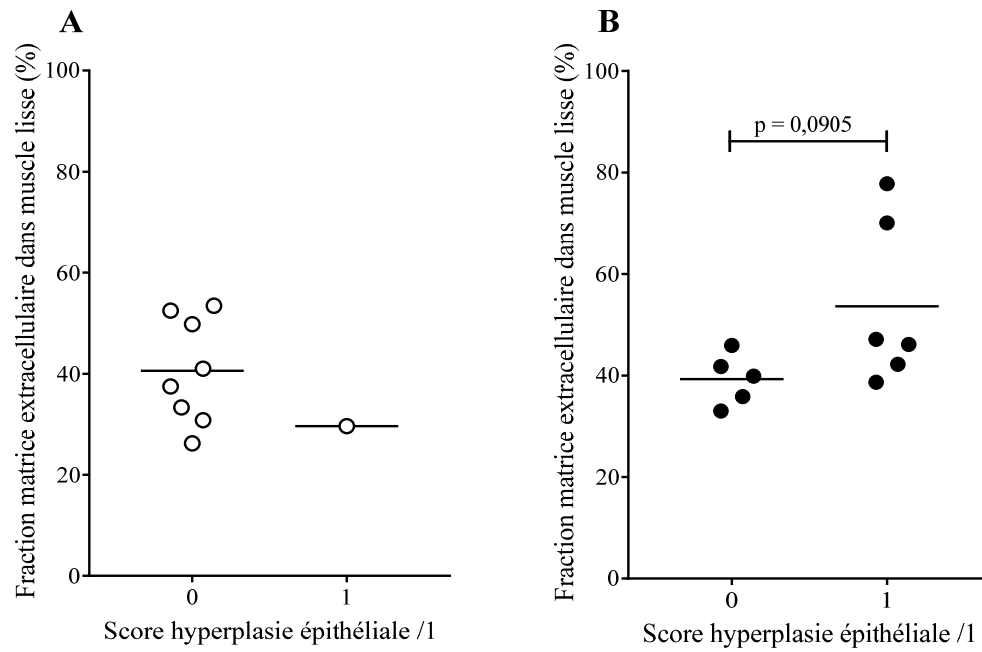


Figure 39. Évaluation de l'association entre la fibrose musculaire lisse et le score d'hyperplasie épithéliale (/1) chez les chevaux contrôles (**A**) et les chevaux asthmatiques (**B**). Ligne horizontale : moyenne.

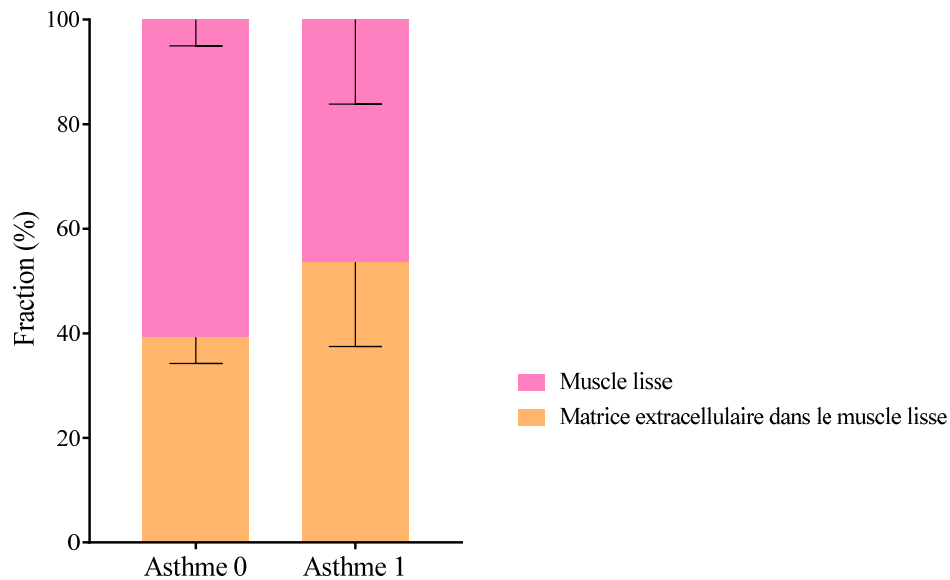


Figure 40. Répartition de la matrice extracellulaire dans le muscle lisse chez les chevaux asthmatiques en fonction du score d'hyperplasie épithéliale. Asthme 0 : hyperplasie épithéliale 0/1 ; Asthme 1 : hyperplasie épithéliale 1/1. Ligne horizontale : écart type.



De plus, la fibrose du muscle lisse est augmentée bien que de manière non statistiquement significative ( $p = 0,06$  ; figure 41) chez les chevaux asthmatiques qui présentent une hyperplasie épithéliale (1/1) par rapport aux chevaux contrôles (quel que soit le score d'hyperplasie). Quinze chevaux dans chaque groupe auraient été nécessaires pour mettre en évidence une différence significative au seuil de 0,05 et ce 80 % du temps.

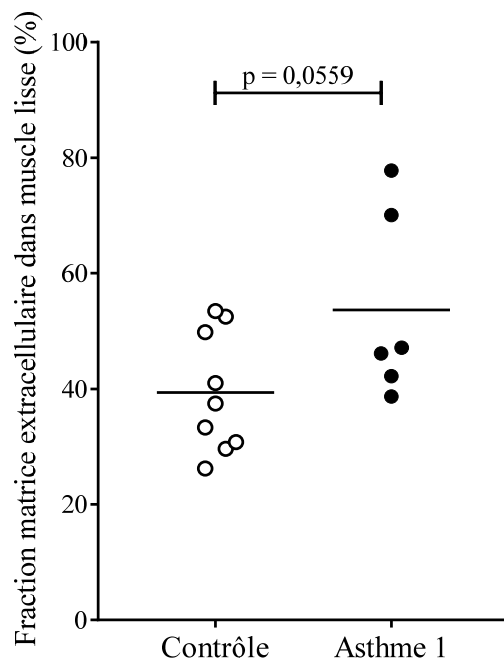


Figure 41. Évaluation de la fraction de fibrose musculaire lisse en fonction du statut contrôle et asthmatique avec une hyperplasie épithéliale (1/1) (Asthme 1). Ligne horizontale : moyenne.

Bien que la fibrose du muscle lisse tende à être augmentée lorsque le score d'hyperplasie épithéliale l'est également, il n'existe pas de corrélation entre l'aire de l'épithélium corrigée et la fraction de matrice extracellulaire dans le muscle lisse ni chez les chevaux asthmatiques ( $r = 0,17$  ;  $p = 0,62$  ; figure 42.B) ni chez les chevaux contrôles ( $r = -0,32$  ;  $p = 0,41$  ; figure 42.A).

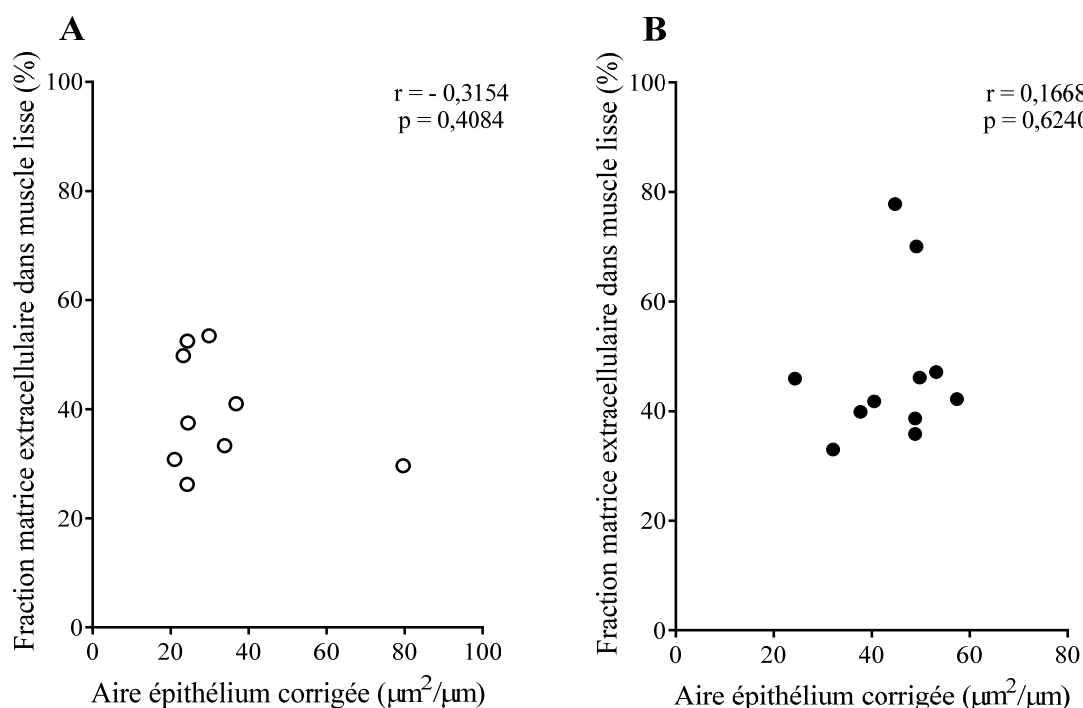


Figure 42. Évaluation de la corrélation entre la fraction de matrice extracellulaire dans le muscle lisse et l'aire de l'épithélium corrigée par la longueur de la membrane basale chez les chevaux contrôles (**A**) et les chevaux asthmatiques (**B**).

Le nombre réduit de chevaux avec un score d'hyperplasie des cellules caliciformes augmenté ( $n = 2$ ) ne nous permet pas d'analyser statistiquement l'association entre la fraction de cellules caliciformes dans l'épithélium et le score d'hyperplasie des cellules caliciformes (1/1). Cependant, la limite entre les deux scores semble être environ 7 % de cellules caliciformes dans l'épithélium chez les chevaux contrôles. En effet, un score de 1/1 a été attribué aux chevaux avec une fraction de cellules caliciformes supérieure à 7 %, et un score de 0/1 à des chevaux avec une fraction inférieure à ce seuil. Chez les chevaux asthmatiques, aucun cheval ne s'est vu attribué un score de 1/1, cependant, tous les chevaux avec un score de 0/1 ont une fraction de cellules caliciformes inférieure à 7 % (figure 43.A et B). En raison d'absence d'analyses statistiques, l'utilisation du score d'hyperplasie des cellules caliciformes pour évaluer l'hyperplasie des cellules caliciformes ne peut être considéré comme fiable.

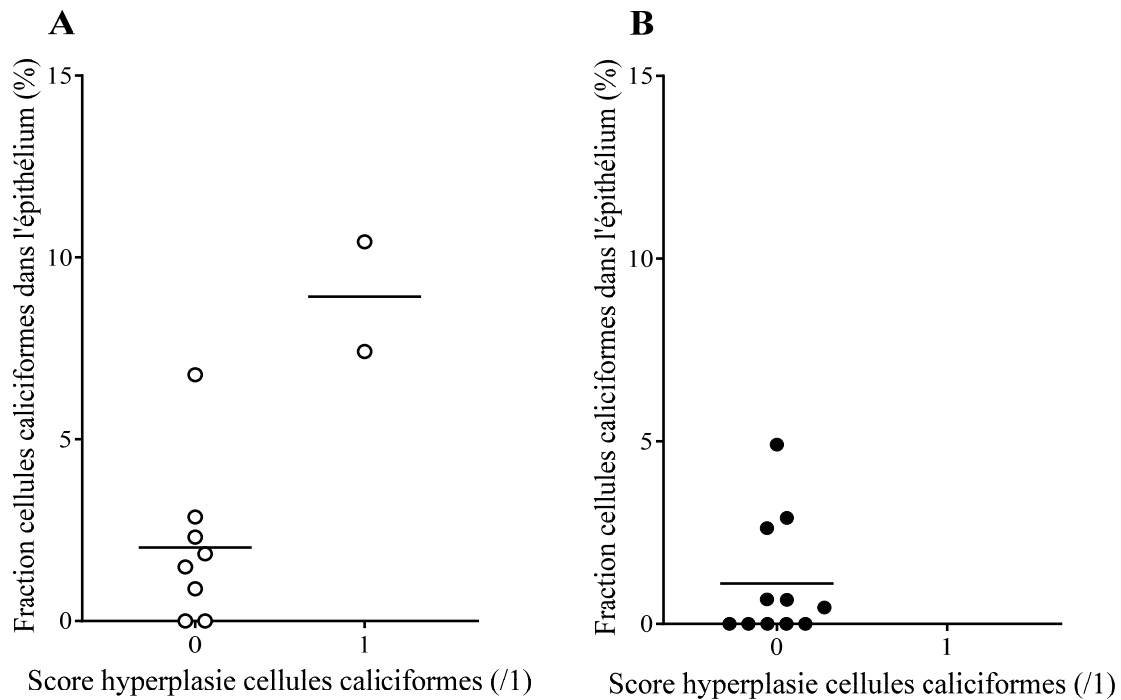


Figure 43. Évaluation de l'association entre la fraction de cellules caliciformes dans l'épithélium et le score d'hyperplasie des cellules caliciformes (/1) chez les chevaux contrôles (A) et les chevaux asthmatiques (B). Ligne horizontale : moyenne.

Les chevaux asthmatiques dont l'épaisseur de la membrane basale est augmentée, sont également caractérisés par un score de membrane basale significativement plus important ( $p = 0,008$  ; figure 44.B). En revanche, il n'existe pas d'association entre la mesure de la membrane basale et le score chez les chevaux contrôles ( $p = 0,14$  ; figure 44.A). Considérant qu'il existe une association significative uniquement chez les chevaux asthmatiques et étant donné le faible nombre de chevaux caractérisés par un score de 1/1 ( $n = 3$ ), le score sur l'épaisseur de la membrane basale pour évaluer la mesure de celle-ci est difficilement utilisable.

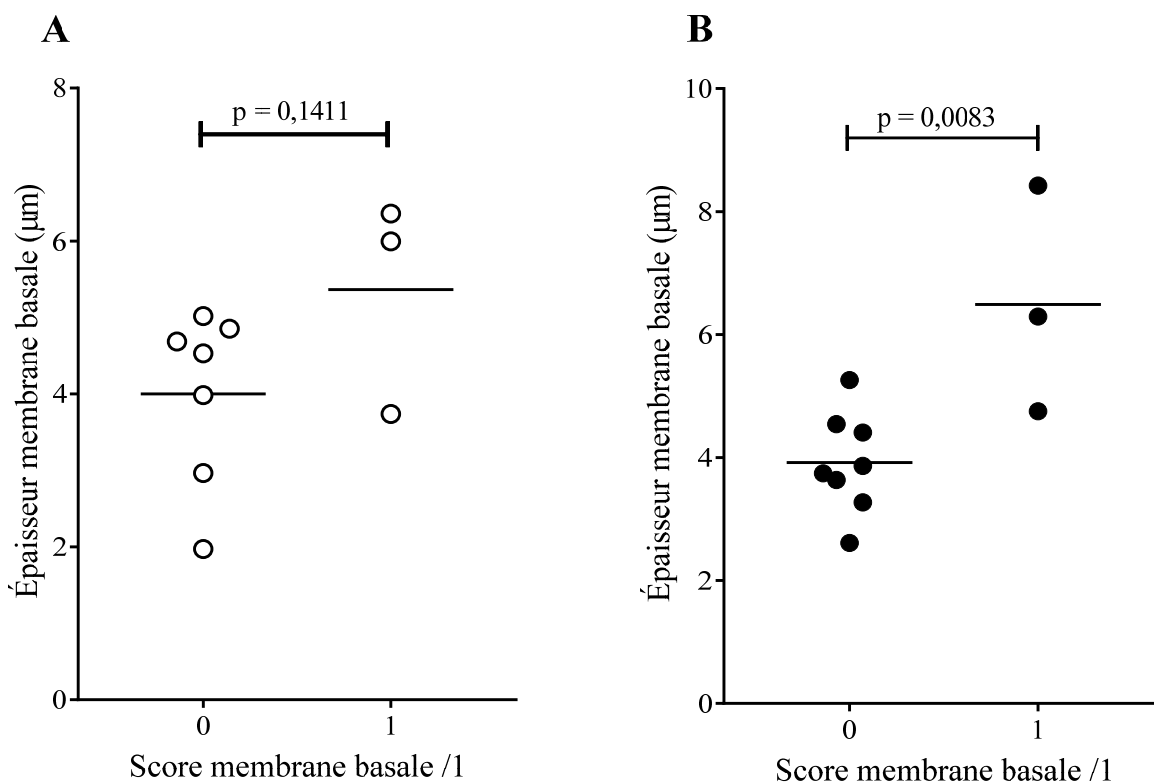


Figure 44. Évaluation de l'association entre l'épaisseur de la membrane basale et le score de membrane basale (/1) chez les chevaux contrôles (**A**) et les chevaux asthmatiques (**B**).

L'absence d'association entre le score de desquamation et la fraction de l'épithélium ou la mesure de l'aire de l'épithélium brute chez les chevaux asthmatiques ( $p = 0,13$  ;  $p = 0,20$  respectivement) et les chevaux contrôles ( $p = 0,18$  ;  $p = 0,59$  respectivement) en fait un score non fiable.

Il n'existe pas d'association entre la fraction de collagène dans le muscle lisse et le score de fibrose musculaire ni chez les chevaux asthmatiques ( $p = 0,72$ ) ni chez les chevaux contrôles ( $p = 0,85$ ). Par conséquent, l'utilisation du score de fibrose musculaire pour évaluer la fraction de collagène dans le muscle lisse bronchique n'est pas fiable.

De plus, aucune corrélation n'a été mise en évidence au sein des chevaux asthmatiques et contrôles respectivement, entre le score de mucus trachéal observé à l'endoscopie et les différents paramètres suivants : le score de glande de mucus de la matrice extracellulaire

( $r = 0,25$  et  $p = 0,60$  ;  $r = -0,33$  et  $p > 0,99$ ), le score de glande à mucus du muscle lisse ( $r = 0,12$  et  $p = 0,98$  ; aucune analyse statistique réalisable pour cette comparaison en raison de l'absence de valeurs associées au score 1/1), le score de glande à mucus total ( $r = 0,24$  et  $p = 0,58$  ;  $r = -0,33$  et  $p > 0,99$ ), le score de cellules caliciformes (aucune analyse statistique réalisable pour cette comparaison en raison de l'absence de valeurs associées au score 1/1 dans les deux groupes), et la fraction de cellules caliciformes dans l'épithélium ( $r = -0,11$  et  $p = 0,76$  ;  $r = -0,54$  et  $p = 0,17$ ).

De plus, chez les chevaux asthmatiques, le score de mucus trachéal n'est corrélé ni avec l'hyperplasie épithéliale évaluée par l'aire de l'épithélium corrigée ( $r = 0,14$  et  $p = 0,96$ ) ni avec la fibrose musculaire ( $r = 0,003$  et  $p = 0,99$ ).

Les critères étudiés suivant les différentes méthodes (mesures histomorphométriques, score semi-quantitatif, inflammation pulmonaire) ont également été évalués en fonction de la durée de condition, cependant, aucune association n'a été mise en évidence.

<b>Associations / corrélations mesures histomorphométriques / score</b>	<b>Test de t ou ANOVA / Pearson Valeur de p / r ; p</b>	<b>Direction de l'effet / Statut</b>
Aire épithélium corrigée / Score hyperplasie épithéliale	0,0076 *	Asthme 1 > Asthme 0
Épaisseur de membrane basale / Score membrane basale	0,008 *	Asthme (n = 3)
Fraction matrice extracellulaire dans muscle lisse / Score hyperplasie épithéliale	0,06 Δ	Asthme 1 > Contrôle
Fraction matrice extracellulaire dans muscle lisse / Score hyperplasie épithéliale	0,09 Δ	Asthme 1 > Asthme 0
Épaisseur de membrane basale / Score membrane basale	0,14	Contrôle
Fraction matrice extracellulaire dans muscle lisse / aire épithélium corrigée	-0,32 ; 0,41	Contrôle
Fraction matrice extracellulaire dans muscle lisse / aire épithélium corrigée	0,17 ; 0,62	Asthme
Fraction de collagène dans muscle lisse / Score fibrose musculaire	0,85	Contrôle
Fraction de collagène dans muscle lisse / Score fibrose musculaire	0,75	Asthme
Score mucus trachéal / Score glandes à mucus (MEC)	-0,33 ; > 0,999	Contrôle
Score mucus trachéal / Score glandes à mucus (MEC)	0,25 ; 0,6	Asthme
Score mucus trachéal / Score glandes à mucus (ML)	/	Contrôle
Score mucus trachéal / Score glandes à mucus (ML)	0,12 ; 0,98	Asthme
Score mucus trachéal / Score glandes à mucus (total)	-0,33 ; > 0,999	Contrôle
Score mucus trachéal / Score glandes à mucus (total)	0,24 ; 0,58	Asthme
Score mucus trachéal / fraction cellules caliciformes dans épithélium	-0,54 ; 0,17	Contrôle
Score mucus trachéal / fraction cellules caliciformes dans épithélium	-0,11 ; 0,76	Asthme
Score mucus trachéal / Score cellules caliciformes	/	Contrôle
Score mucus trachéal / Score cellules caliciformes	/	Asthme
Fraction de l'épithélium / Score desquamation	0,18	Contrôle
Fraction de l'épithélium / Score desquamation	0,13	Asthme
Aire épithélium / Score desquamation	0,59	Contrôle
Aire épithélium / Score desquamation	0,20	Asthme
Aire épithélium corrigée / Score hyperplasie épithéliale	/	Contrôle
Fraction matrice extracellulaire dans muscle lisse / Score hyperplasie épithéliale	/	Contrôle
Fraction cellules caliciformes dans l'épithélium / Score hyperplasie cellules caliciformes	/	Contrôle
Fraction cellules caliciformes dans l'épithélium / Score hyperplasie cellules caliciformes	/	Asthme

Tableau IV. Tableau récapitulatif des corrélations et associations entre les mesures histomorphométriques ou le score semi-quantitatif et le score histologique semi-quantitatif. Asthme 1, chevaux asthmatiques avec un score d'hyperplasie épithéliale 1/1 \* différence significative ( $p < 0,05$ ) ; Δ tendance à une différence significative ( $p \leq 0,1$ ).

## Discussion générale

Il s'agit de la première étude évaluant le remodelage des voies respiratoires centrales de chevaux asthmatiques légers/modérés. Les méthodes d'histomorphométrie et l'utilisation du score semi-quantitatif ont permis de mettre en évidence une infiltration cellulaire dans la lamina propria, un remodelage de la lamina propria et de l'épithélium chez les chevaux asthmatiques légers/modérés. Dans cette étude, deux phénotypes semblent se distinguer sur la base du remodelage de l'épithélium bronchique et du type d'inflammation pulmonaire. En effet, l'inflammation pulmonaire neutrophilique des chevaux asthmatiques est corrélée à l'hyperplasie épithéliale elle-même associée à la fibrose du muscle lisse. D'autre part, l'inflammation pulmonaire mastocytaire tend à être corrélée négativement avec l'hyperplasie épithéliale et la fibrose du muscle lisse.

L'augmentation de l'épaisseur de la lamina propria évaluée par des méthodes histomorphométriques chez les chevaux asthmatiques légers/modérés par rapport aux chevaux contrôles est également rapportée chez les chevaux asthmatiques sévères [78]. De plus, la fraction totale de matrice extracellulaire dans la biopsie corrèle positivement avec la distance entre la membrane basale et le muscle lisse chez les chevaux asthmatiques légers/modérés. Par conséquent, l'évaluation de cette distance permet d'extrapoler la fraction totale de la matrice extracellulaire dans la biopsie, validant ainsi l'utilisation de cette distance pour évaluer cette fraction. Cette augmentation de l'épaisseur de la lamina propria pourrait contribuer à l'obstruction des voies respiratoires comme c'est le cas au niveau des voies respiratoires périphériques chez les chevaux asthmatiques sévères [84]. En effet, chez les chevaux asthmatiques sévères en rémission, l'épaisseur de la lamina propria corrèle positivement avec la résistance pulmonaire suggérant une obstruction résiduelle des voies respiratoires. Chez les chevaux contrôles la fraction de fibres élastiques dans la matrice extracellulaire diminue de manière significative avec l'âge. Cette diminution est également mise en évidence chez l'homme [112] et la souris sains [113] prédisposant à l'altération de la fonction respiratoire. Dans l'étude de Setlakwe et collaborateurs [84], chez les chevaux contrôles la fraction de fibres élastiques corrélait positivement avec l'élastance pulmonaire. Par conséquent, l'excès, mais également le défaut en fibres élastiques dans la matrice extracellulaire des poumons altéreraient

la fonction respiratoire. Cette diminution avec l'âge n'est pas mise en évidence chez les chevaux asthmatiques légers modérés. Bien que les groupes soient appariés pour l'âge, les chevaux asthmatiques contrôles présentent une étendue de l'âge plus importante que chez les chevaux asthmatiques légers/modérés. De plus, l'augmentation de la fraction de fibres élastiques secondaire à la maladie pourrait être compensée par la détérioration de celles-ci avec l'âge.

Les mesures de l'aire brute et de la fraction de l'épithélium dans la biopsie évaluent son entièreté et ne permettent pas différencier les zones desquamées ou les artefacts de coupe. De plus, ces mesures ne corrèlent pas avec la mesure de l'aire de l'épithélium corrigée par la longueur de la membrane basale (données non présentées), qui elle évalue de manière fiable l'hyperplasie épithéliale. En effet, la correction de l'aire permet de standardiser les mesures pour les différentes tailles de biopsie obtenue et d'en exclure les fractions d'épithélium desquamées physiologiquement ou mécaniquement. Par conséquent, la mesure brute et la fraction de l'épithélium ne permettent d'évaluer ni l'hyperplasie ni la desquamation épithéliale de manière fiable. L'hyperplasie épithéliale pourrait également être évaluée en corrigeant l'aire de l'épithélium par le nombre de noyaux des cellules épithéliales, tel qu'il a été réalisé pour évaluer l'hyperplasie du muscle lisse bronchique dans les voies respiratoires périphériques [79]. De plus, à la lecture du score de desquamation, il est très difficile de différencier la desquamation épithéliale des artefacts mécaniques du prélèvement ou de la préparation histologique des lames. Pour ces raisons, le score de desquamation épithéliale ne peut être utilisé de manière fiable.

Le score semi-quantitatif mis en place chez les chevaux asthmatiques sévères [69] utilisé dans notre étude permet de différencier de manière significative les chevaux asthmatiques légers/modérés des chevaux contrôles avec une sensibilité plus importante et une spécificité semblable à celle des chevaux asthmatiques sévères [69]. Sur base de ce score, il existe certaines similitudes entre le remodelage des chevaux asthmatiques sévères et des chevaux asthmatiques légers/modérés laissant supposer une progression du remodelage vers le stade sévère. En effet, l'infiltration de cellules inflammatoires dans la sous-muqueuse et l'hyperplasie épithéliale sont augmentées dans les deux formes de la maladie (bien que de manière non significative pour l'hyperplasie épithéliale chez les chevaux asthmatiques sévères en exacerbation par rapport aux chevaux en rémission ( $p = 0,06$ ) [69]. L'utilisation de ces deux critères responsables de la



significativité permet d'augmenter la spécificité du score dans l'étude actuelle et de réaliser le score rapidement en clinique.

Malgré ces similitudes, il existe certaines différences entre les deux formes, telles que l'infiltration de cellules inflammatoires dans l'épithélium est augmentée chez les chevaux asthmatiques en exacerbation par rapport aux chevaux asthmatiques en rémission, alors qu'il n'existe pas de différence significative entre les chevaux asthmatiques légers/modérés et les chevaux contrôles ( $p = 0,14$ ). Ces différences entre les 2 formes pourraient expliquer les différents signes cliniques et l'absence de signes respiratoires au repos chez les chevaux asthmatiques légers/modérés. Les chevaux asthmatiques légers/modérés tout comme les chevaux asthmatiques sévères au stade de rémission ne présentent pas ou peu de signes respiratoires au repos, cependant le remodelage entre ces deux formes diffère. En effet, contrairement à ce qui est mis en évidence chez les chevaux asthmatiques sévères en rémission, les chevaux asthmatiques légers/modérés ne présentent pas d'augmentation du nombre de cellules caliciformes [80], ni des glandes à mucus dans le muscle lisse bronchique par rapport aux chevaux contrôles [69]. Par conséquent, le remodelage présent dans ces deux formes, bien que différent, n'est à ce stade pas responsable de signes respiratoires au repos, mais est suffisamment important pour entraîner de l'intolérance à l'exercice ou de la toux chez les chevaux asthmatiques légers/modérés.

L'évaluation de la fiabilité du score semi-quantitatif est réalisée en évaluant l'association entre les mesures histomorphométriques et les différentes valeurs du score semi-quantitatif attribuées pour un critère. L'utilisation de ce score est un outil plus rapide que les mesures histomorphométriques pour caractériser les biopsies d'où son intérêt en clinique. Le score d'hyperplasie épithéliale peut être utilisé de manière fiable chez les chevaux asthmatiques légers/modérés, en effet, l'aire de l'épithélium corrigée est plus importante chez les chevaux qui présentent un score d'hyperplasie épithéliale augmenté. Bien que chez les chevaux contrôles une augmentation du score d'hyperplasie épithéliale ne soit pas attendue, un nombre plus important de chevaux contrôles avec un score augmenté serait nécessaire pour confirmer sa fiabilité chez ces chevaux. En effet, la présence d'un seul cheval contrôle avec un score d'hyperplasie épithéliale de 1/1 ne nous permet pas d'évaluer statistiquement l'association entre les 2 techniques d'évaluation du remodelage épithélial. En médecine humaine, l'épaisseur de la

membrane basale est augmentée chez les patients asthmatiques par rapport aux patients contrôles sains [114]. Le traitement à base de corticostéroïdes inhalés diminue son épaisseur, l'inflammation pulmonaire et améliore la fonction respiratoire [115; 116]. En revanche, chez les chevaux asthmatiques sévères, l'épaisseur de la membrane basale est augmentée de manière occasionnelle [77]. Dans notre étude, il n'existe pas de différence significative entre les chevaux asthmatiques légers/modérés par rapport aux chevaux contrôles. Le score semi-quantitatif évaluant l'épaisseur de la membrane basale est associé à l'épaisseur mesurée chez les chevaux asthmatiques, cependant un échantillon aussi petit que 3 chevaux avec un score de 1/1 est difficilement représentatif de la population et un nombre plus important de chevaux avec ce score serait nécessaire pour confirmer la fiabilité de celui-ci. Chez les chevaux contrôles, aucune association n'est mise en évidence entre le score de la membrane basale et l'épaisseur mesurée, cependant tel que pour les chevaux asthmatiques, 3 chevaux avec un score augmenté n'est pas représentatif de la population. Le score d'hyperplasie des cellules caliciformes n'est pas évaluable statistiquement, en effet, seulement 2 chevaux contrôles présentent un score augmenté (1/1) et aucun cheval asthmatique ne présente un tel score. Un plus grand échantillon serait par conséquent nécessaire pour déterminer statistiquement sa validité.

En médecine humaine, la fraction de muscle lisse est à l'origine de l'hypersensibilité des voies respiratoires [86]. En médecine vétérinaire, le muscle lisse des voies respiratoires centrales et périphériques est augmenté chez les chevaux asthmatiques sévères en exacerbation par rapport aux chevaux en rémission [11; 33] et aux chevaux contrôles [79]. Dans notre étude, le muscle lisse bronchique des voies respiratoires centrales est de taille similaire à celui mis en évidence chez les chevaux contrôles. Tel qu'il a été décrit dans l'étude de Bullone et collaborateurs [78], aucune augmentation de l'aire totale ou relative du muscle lisse bronchique n'a été mise en évidence dans notre étude. En effet, l'épaississement de la lamina propria chez les chevaux asthmatiques sévères en exacerbation limite le prélèvement du muscle lisse dans son épaisseur lors de biopsie endobronchique, l'entière du muscle lisse n'est pas évaluable et les modifications quantitatives sont difficilement interprétables. La technique de prélèvement de biopsies endobronchiques n'est pas adaptée pour évaluer l'aire du muscle lisse bronchique [78]. Contrairement à l'étude de Leclère et collaborateurs [79], aucune diminution de l'aire relative du muscle lisse n'a été mise en évidence. Il a été émis l'hypothèse que l'augmentation

de l'épaisseur de la lamina propria dans les voies respiratoires périphériques de chevaux asthmatiques sévères, aurait pour rôle d'antagoniser les effets bronchoconstricteurs du muscle lisse bronchique [84]. Dans cette étude, la méthode de prélèvement de biopsies endobronchiques ne permet pas d'évaluer la taille du muscle lisse bronchique. Par conséquent, l'augmentation de la lamina propria en réponse aux effets bronchoconstricteurs du muscle lisse bronchique ne peut être évaluée chez les chevaux asthmatiques légers/modérés. Tels qu'utilisés dans l'étude de Leclère et collaborateurs [79], la mesure de la densité des myocytes ainsi que l'utilisation de marqueurs de prolifération tels que PCNA+ (proliferating cell nuclear antigen) et TUNEL+ (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), permettraient d'évaluer la dynamique du remodelage du muscle lisse des voies respiratoires centrales chez les chevaux asthmatiques légers/modérés. En effet, ces deux marqueurs permettent d'évaluer respectivement la prolifération et l'apoptose cellulaire. L'un des isoformes de la myosine, appelé (+)insert, augmente significativement dans les voies respiratoires centrales et périphériques des chevaux asthmatiques sévères en exacerbation comparés aux chevaux en rémission ou contrôles [94]. L'expression de cet isoforme est réversible lors de traitement de la condition et pourrait contribuer au bronchospasme des voies respiratoires. Il serait intéressant dans une étude future d'évaluer cet isoforme de la myosine, dans le muscle lisse bronchique de chevaux asthmatiques légers/modérés et de le comparer à des chevaux contrôles sains. De plus, associer l'échographie endobronchique aux méthodes histomorphométriques permettrait d'évaluer la fraction de muscle lisse bronchique des voies respiratoires centrales et d'en extrapoler celle présente dans les voies respiratoires périphériques [77].

La fraction de matrice extracellulaire dans le muscle lisse est composée majoritairement de collagène et représente 20 % de l'aire du muscle lisse chez les chevaux asthmatiques sévères [11]. De même, dans notre étude, la fibrose musculaire des chevaux asthmatiques légers/modérés est composée de collagène, mais représente une fraction plus importante que celle mise en évidence chez les chevaux asthmatiques sévères. Cette différence, en faveur d'une fraction de collagène dans le muscle lisse plus importante chez les chevaux asthmatiques légers/modérés par rapport aux chevaux asthmatiques sévères peut être expliquée par un biais de lecture inter-évaluateur, plutôt qu'à une réelle augmentation de la fibrose musculaire chez les chevaux asthmatiques légers/modérés. De plus, dans notre étude, les chevaux contrôles

présentent également une fraction de collagène plus importante que celle mise en évidence chez les chevaux asthmatiques sévères [11]. Dans l'étude de Bullone et collaborateurs, la fraction de matrice extracellulaire dans le muscle lisse chez les chevaux asthmatiques sévères en exacerbation diminue avec un traitement de 12 semaines à base de fluticasone + salmétérol et tend à diminuer avec un traitement de salmétérol seul, toutes deux associées à une amélioration de la fonction respiratoire [11]. Considérant les signes cliniques importants au repos des chevaux asthmatiques sévères en exacerbation comparés aux chevaux asthmatiques légers/modérés et aux chevaux contrôles, il est attendu que la fibrose et le remodelage des voies respiratoires soit moins important chez ces derniers chevaux. Bien qu'une erreur de lecture inter-évaluateur semble responsable des différents résultats entre les études, une différence réelle entre les différentes formes ne peut être exclue.

L'augmentation non significative de la fraction de cellules caliciformes mise en évidence chez les chevaux contrôles par rapport aux chevaux asthmatiques légers/modérés peut être expliquée par une sous-estimation du nombre de cellules secondaire à la dégranulation de celles-ci chez les chevaux asthmatiques rendant leur identification plus difficile, plutôt qu'à une réelle diminution du nombre de ces cellules chez ces chevaux. Une augmentation du nombre de cellules caliciformes était attendue chez les chevaux asthmatiques légers/modérés, en effet, d'après l'étude de Robinson, il existe une corrélation positive entre le nombre de cellules caliciformes et le score de mucus trachéal [87]. Bien que le score de mucus soit augmenté chez les chevaux asthmatiques légers/modérés dans cette étude, ni la fraction de cellules caliciformes ni le score d'hyperplasie des cellules caliciformes ne sont augmentés, tel que cette corrélation n'est pas vérifiée dans notre étude. De plus, chez les chevaux asthmatiques sévères en rémission, le score d'hyperplasie des cellules caliciformes est augmenté par rapport aux chevaux contrôles. Le stade de la maladie (exacerbation VS rémission) n'influence pas le nombre de cellules caliciformes dans l'épithélium [69]. L'augmentation du score de mucus trachéal mis en évidence lors de l'endoscopie des voies respiratoires peut être expliquée par une augmentation de la production du mucus sans augmentation des structures qui la produisent ou, tel que rapporté dans des études précédentes [13; 16], à une altération de la viscoélasticité du mucus ou de l'efficacité et de l'intégrité de l'appareil mucociliaire diminuant ainsi la clairance. Tel que décrit dans des études précédentes [15], le score de mucus trachéal est augmenté de 2 à 5/5 chez les

chevaux asthmatiques légers/modérés par rapport aux chevaux contrôles. Dans notre étude, un score de mucus trachéal supérieur ou égal à 1/5 nous permet déjà de diagnostiquer un cheval asthmatique avec une sensibilité de 91 % et spécificité de 75 %.

D'après l'étude de Bullone et collaborateur, l'inflammation pulmonaire neutrophilique semble associée négativement au remodelage des voies respiratoires périphériques [70]. En effet, chez les chevaux asthmatiques sévères en exacerbation, le remodelage modéré à sévère des voies respiratoires périphériques est associé à une inflammation pulmonaire neutrophilique plus légère contrairement aux chevaux qui présentent un léger remodelage tissulaire. Dans notre étude, le score semi-quantitatif (/14) tend à corrélér positivement avec l'inflammation pulmonaire neutrophilique ( $p = 0,05$ ) chez les chevaux asthmatiques légers/modérés. Cette tendance est associée au score d'hyperplasie épithéliale qui corrèle positivement avec l'inflammation pulmonaire neutrophilique chez ces chevaux. De la même manière, l'hyperplasie épithéliale évaluée par la mesure de l'aire de l'épithélium corrigée est corrélée positivement avec la neutrophilie pulmonaire. Aucune autre corrélation n'a été mise en évidence avec la neutrophilie. Ces résultats renforcent l'idée que l'inflammation pulmonaire neutrophilique est associée à certaines formes de remodelage bronchique des voies respiratoires centrales. Les résultats opposés entre les deux études quant à la relation entre le remodelage des voies respiratoires et l'inflammation pulmonaire doivent être comparées avec précaution, en effet, la forme de la maladie et le type de voies respiratoires évaluées sont différents. Chez les chevaux contrôles dans notre étude, seule la fibrose du muscle lisse tend à corrélér positivement avec la fraction de mastocytes pulmonaires ( $r = 0,60$  ;  $p = 0,09$ ), alors que chez les chevaux asthmatiques légers/modérés elle tend à corrélér négativement ( $r = -0,57$  ;  $p = 0,06$ ). De même, bien que certains aspects du remodelage tels que l'hyperplasie épithéliale et la fraction de collagène dans le muscle lisse semblent associés au type d'inflammation pulmonaire, des groupes de chevaux plus nombreux seraient toutefois nécessaires pour valider ou non ces tendances. D'autres études sont également indispensables afin d'évaluer le remodelage associé à une inflammation éosinophilique.

L'évaluation de la fonction respiratoire de chevaux asthmatiques légers/modérés combinée à l'étude du remodelage bronchique seraient utiles pour apprécier l'impact du remodelage sur la fonction respiratoire, afin d'évaluer si comme chez les chevaux asthmatiques

sévères, l'augmentation de l'épaisseur de la lamina propria entre autres est associée à l'obstruction des voies respiratoires. De plus, il serait intéressant, d'effectuer un suivi de l'évolution des signes cliniques et du remodelage des voies respiratoires centrales des chevaux de cette étude afin de déterminer quel tissu remodelé, s'il existe, permettrait de prédire l'évolution de la maladie vers l'asthme sévère si elle a lieu. Le score semi-quantitatif nouvellement établi sur 3 points pourrait être ainsi complété et être utile dans le diagnostic de ces chevaux dans le but de mettre en place un traitement précoce approprié. Considérant l'absence de signe clinique au repos et la présence de remodelage chez les chevaux asthmatiques légers/modérés, la gestion de l'environnement par la suppression du foin et la mise au pâturage semble le traitement le plus approprié pour ces chevaux. La suppression de l'antigène est le traitement le moins rapide pour diminuer le remodelage des chevaux asthmatiques sévères. En effet, la combinaison de corticostéroïdes et de  $\beta$ -2 agoniste inhalés est plus rapide pour réverser le remodelage au niveau du muscle lisse et de la lamina propria chez les chevaux asthmatiques sévères. L'évaluation du remodelage est cependant nécessaire au cours des traitements pour évaluer leur efficacité sur le remodelage des voies respiratoires centrales. Les chevaux asthmatiques de cette étude présentant une inflammation neutrophilique, une hyperplasie de l'épithélium et une tendance à la fibrose du muscle lisse seraient selon nous, la catégorie de chevaux asthmatiques susceptible d'évoluer vers la forme sévère si aucun traitement visant à limiter le remodelage n'est mis en place de manière précoce.

Le remodelage des voies respiratoires périphériques est plus important que celui des voies respiratoires centrales chez les chevaux asthmatiques sévères, il serait par conséquent intéressant d'évaluer le remodelage périphérique des chevaux asthmatiques légers/modérés. Ce remodelage permettrait peut-être de prédire de manière plus précoce l'évolution de la maladie vers la forme sévère. Bien que la technique de thoracoscopie soit largement utilisée en recherche pour évaluer le remodelage des voies respiratoires périphériques [11; 33; 79], elle est également utilisée en clinique lorsque d'autres techniques moins invasives ne permettent pas de poser un diagnostic [117]. Bien que cette technique soit minimalement invasive il est difficilement envisageable de l'utiliser en clinique dans un but diagnostique alors que d'autres techniques moins invasives, tels que le lavage bronchoalvéolaire sont disponibles.

Cette étude présente quelques limites, telles que le nombre insuffisant de chevaux. En effet, certaines différences non significatives auraient pu l'être si le nombre de chevaux dans l'étude avait été plus important. Vingt chevaux par groupe auraient été nécessaires pour mettre en évidence une augmentation significative de la fibrose du muscle lisse chez les chevaux présentant un score d'hyperplasie épithéliale augmenté, par rapport aux chevaux asthmatiques ne présentant pas d'hyperplasie épithéliale et par rapport aux chevaux contrôles quel que soit leur score d'hyperplasie. De plus, un plus grand nombre de chevaux dans les différentes classes d'inflammation : mastocyte et éosinophile serait nécessaire, en effet, dans cette étude, les analyses statistiques sont parfois limitées. Considérant la mauvaise orientation de certaines biopsies, dans le futur, un nombre plus important de biopsies endobronchiques devrait être prélevé et conservé dans la formaline. Les mesures dans cette étude ont été effectuées sur en moyenne 1,2 biopsies par cheval et cela semble insuffisant. En effet, pour certains critères tels que le muscle, une seule biopsie était exploitable, de plus, l'évaluation du score semi-quantitatif a parfois nécessité l'utilisation de plusieurs biopsies pour évaluer toutes les structures. Dans l'étude de Bullone et collaborateurs [11], cinq biopsies par cheval avec un score de qualité de biopsie acceptable ont été utilisées et semblaient adéquates. L'aire du muscle lisse n'a pas pu être évalué considérant la technique de prélèvement non adéquate [78]. Le muscle lisse bronchique semble jouer un rôle important dans la clinique de la maladie, par conséquent, l'évaluation du muscle lisse par échographie endobronchique est recommandée pour une étude future. De plus, l'évaluation de l'association entre la fonction respiratoire et le remodelage bronchique serait pertinente.

## Conclusion et perspectives

Les chevaux asthmatiques légers/modérés, bien que souvent exempts de signes cliniques respiratoires au repos, présentent un remodelage bronchique partiellement semblable à celui mis en évidence chez les chevaux asthmatiques sévères en exacerbation. Ce remodelage se situe dans la lamina propria, et l'épithélium. Une infiltration de cellules inflammatoires dans la lamina propria est également présente chez ces chevaux. L'inflammation pulmonaire semble être associée au remodelage bronchique. En effet, la neutrophilie pulmonaire corrèle positivement avec l'hyperplasie épithéliale et l'inflammation mastocytaire tend à corrélérer négativement avec l'hyperplasie épithéliale et la fibrose du muscle lisse. Les chevaux asthmatiques qui présentent une hyperplasie épithéliale présentent également une augmentation de la fibrose du muscle lisse, mais aucune association avec l'inflammation pulmonaire n'est mise en évidence.

L'évaluation histologique des biopsies endobronchiques associée à une échographie endobronchique permettrait d'évaluer de manière complète le remodelage bronchique des voies respiratoires centrales. L'utilisation du score semi-quantitatif basé sur les 2 critères significatifs permet de diagnostiquer des chevaux asthmatiques légers/modérés. Cependant, l'évaluation de l'évolution du remodelage dans le temps serait utile pour cibler des critères du remodelage bronchique prédisposant à la progression du syndrome vers la forme sévère. Dans un cadre clinique, l'utilisation d'un score semi-quantitatif plus spécifique et sensible à la progression vers la forme sévère permettrait de mettre en place un traitement précoce afin de limiter cette évolution. Par conséquent, des études prospectives évaluant l'évolution du remodelage bronchique des voies respiratoires centrales en réponse à la mise en place d'un traitement seraient intéressantes.



## Bibliographie

- [1] Robinson, N.E. and Furlow, P.W. (2007) Anatomy of the Respiratory System. In: *Equine Respiratory Medicine and Surgery*, Eds: B.C. McGorum, P.M. Dixon, N.E. Robinson and J. Schumacher. pp 3-17.
- [2] Art, T. and Lekeux, P. (1991) The effect of shape, age and extension on the compliance of equine tracheal segments. *Vet Res Commun* **15**, 135-146.
- [3] Art, T. and Lekeux, P. (1991) Mechanical properties of the isolated equine trachea. *Res Vet Sci* **51**, 55-60.
- [4] Collin, B. (2010) Troisième partie : Appareil respiratoire. In: *Anatomie du cheval*, Ed: Derouaux-Ordina. pp 297-331.
- [5] Widdicombe, J.H. and Pecson, I.S. (2002) Distribution and numbers of mucous glands in the horse trachea. *Equine Vet J* **34**, 630-633.
- [6] Tyler, W.S., Gillespie, J.R. and Nowell, J.A. (1971) Modern functional morphology of the equine lung. *Equine Vet J* **3**, 84-94.
- [7] McLaughlin, R.F., Tyler, W.S. and Canada, R.O. (1961) A study of the subgross pulmonary anatomy in various mammals. *Am J Anat.* **108**, 149-165.

[8] Fraser, R. (2005) Histology and gross anatomy of the respiratory tract. In: *Physiologic basis of respiratory disease*, Eds: Q. Hamid, J. Shannon and J. Martin, Hamilton: B.C. Decker inc. pp 1-14.

[9] Brinkman, G.L., Brooks, N. and Bryant, V. (1969) The ultrastructure of the lamina propria of the human bronchus. *Am Rev Respir Dis* **99**, 219-228.

[10] Bullone, M., Pouyet, M. and Lavoie, J.P. (2017) Age associated changes in peripheral airway smooth muscle mass of healthy horses. *Vet J* **226**, 62-64.

[11] Bullone, M., Vargas, A., Elce, Y., Martin, J.G. and Lavoie, J.P. (2017) Fluticasone/salmeterol reduces remodelling and neutrophilic inflammation in severe equine asthma. *Sci Rep* **7**, 8843.

[12] Kaup, F.J., Drommer, W., Damsch, S. and Deegen, E. (1990) Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). II: Pathomorphological changes of the terminal airways and the alveolar region. *Equine Vet J* **22**, 349-355.

[13] Art, T., McGorum, B. and Lekeux, P. (2002) Environmental Control of Respiratory Disease. Retrieved from [http://www.ivis.org/special\\_books/Lekeux/art2/ivis.pdf?origin=publication\\_detail](http://www.ivis.org/special_books/Lekeux/art2/ivis.pdf?origin=publication_detail).

[14] Lavoie, J.P. (2015) Is the time primed for equine asthma? *Equine vet educ* **27**, 225-226.

- [15] Couetil, L.L., Cardwell, J.M., Gerber, V., Lavoie, J.P., Leguillette, R. and Richard, E.A. (2016) Inflammatory Airway Disease of Horses--Revised Consensus Statement. *J Vet Intern Med* **30**, 503-515.
- [16] Leclere, M., Lavoie-Lamoureux, A. and Lavoie, J.P. (2011) Heaves, an asthma-like disease of horses. *Respirology* **16**, 1027-1046.
- [17] Leguillette, R. (2003) Recurrent airway obstruction--heaves. *Vet Clin North Am Equine Pract* **19**, 63-86, vi.
- [18] Hotchkiss, J.W., Reid, S.W. and Christley, R.M. (2007) A survey of horse owners in Great Britain regarding horses in their care. Part 2: Risk factors for recurrent airway obstruction. *Equine Vet J* **39**, 301-308.
- [19] Tesarowski, D.B., Viel, L. and McDonell, W.N. (1996) Pulmonary function measurements during repeated environmental challenge of horses with recurrent airway obstruction (heaves). *Am J Vet Res* **57**, 1214-1219.
- [20] Ramseyer, A., Gaillard, C., Burger, D., Straub, R., Jost, U., Boog, C., Marti, E. and Gerber, V. (2007) Effects of genetic and environmental factors on chronic lower airway disease in horses. *J Vet Intern Med* **21**, 149-156.
- [21] Marti, E., Gerber, H., Essich, G., Oulehla, J. and Lazary, S. (1991) The genetic basis of equine allergic diseases. 1. Chronic hypersensitivity bronchitis. *Equine Vet J* **23**, 457-460.

[22] Couetil, L.L., Hoffman, A.M., Hodgson, J., Buechner-Maxwell, V., Viel, L., Wood, J.L. and Lavoie, J.P. (2007) Inflammatory airway disease of horses. *J Vet Intern Med* **21**, 356-361.

[23] Bosshard, S. and Gerber, V. (2014) Evaluation of coughing and nasal discharge as early indicators for an increased risk to develop equine recurrent airway obstruction (RAO). *J Vet Intern Med* **28**, 618-623.

[24] Koblinger, K., Nicol, J., McDonald, K., Wasko, A., Logie, N., Weiss, M. and Leguillette, R. (2011) Endoscopic assessment of airway inflammation in horses. *J Vet Intern Med* **25**, 1118-1126.

[25] Gerber, V., Lindberg, A., Berney, C. and Robinson, N.E. (2004) Airway mucus in recurrent airway obstruction--short-term response to environmental challenge. *J Vet Intern Med* **18**, 92-97.

[26] Lavoie, J.P., Cesarini, C., Lavoie-Lamoureux, A., Moran, K., Lutz, S., Picandet, V., Jean, D. and Marcoux, M. (2011) Bronchoalveolar lavage fluid cytology and cytokine messenger ribonucleic Acid expression of racehorses with exercise intolerance and lower airway inflammation. *J Vet Intern Med* **25**, 322-329.

[27] Rossdale, P.D., Hopes, R., Digby, N.J. and Offord, K. (1985) Epidemiological study of wastage among racehorses 1982 and 1983. *Vet Rec* **116**, 66-69.

[28] Ivester, K.M., Couetil, L.L., Moore, G.E., Zimmerman, N.J. and Raskin, R.E. (2014) Environmental exposures and airway inflammation in young thoroughbred horses. *J Vet Intern Med* **28**, 918-924.

[29] Nyman, G., Lindberg, R., Weckner, D., Bjork, M., Kvarf, C., Persson, S.G., Gustafsson, H. and Hedenstierna, G. (1991) Pulmonary gas exchange correlated to clinical signs and lung pathology in horses with chronic bronchiolitis. *Equine Vet J* **23**, 253-260.

[30] Leguillette, R., Tohver, T., Bond, S.L., Nicol, J.A. and McDonald, K.J. (2017) Effect of Dexamethasone and Fluticasone on Airway Hyperresponsiveness in Horses With Inflammatory Airway Disease. *J Vet Intern Med* **31**, 1193-1201.

[31] Couetil, L.L., Chilcoat, C.D., DeNicola, D.B., Clark, S.P., Glickman, N.W. and Glickman, L.T. (2005) Randomized, controlled study of inhaled fluticasone propionate, oral administration of prednisone, and environmental management of horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res* **66**, 1665-1674.

[32] Dixon, P.M., Railton, D.I., McGorum, B.C. and Tothill, S. (1995) Equine pulmonary disease: a case control study of 300 referred cases. Part 4: Treatments and re-examination findings. *Equine Vet J* **27**, 436-439.

[33] Leclerc, M., Lavoie-Lamoureux, A., Joubert, P., Relave, F., Setlakwe, E.L., Beauchamp, G., Couture, C., Martin, J.G. and Lavoie, J.P. (2012) Corticosteroids and antigen avoidance decrease airway smooth muscle mass in an equine asthma model. *Am J Respir Cell Mol Biol* **47**, 589-596.

[34] Vandenput, S., Istasse, L., Nicks, B. and Lekeux, P. (1997) Airborne dust and aeroallergen concentrations in different sources of feed and bedding for horses. *Vet Q* **19**, 154-158.

[35] Clements, J.M. and Pirie, R.S. (2007) Respirable dust concentrations in equine stables. Part 1: validation of equipment and effect of various management systems. *Res Vet Sci* **83**, 256-262.

[36] Woods, P.S., Robinson, N.E., Swanson, M.C., Reed, C.E., Broadstone, R.V. and Derksen, F.J. (1993) Airborne dust and aeroallergen concentration in a horse stable under two different management systems. *Equine Vet J* **25**, 208-213.

[37] Nogradi, N., Couetil, L.L., Messick, J., Stochelski, M.A. and Burgess, J.R. (2015) Omega-3 fatty acid supplementation provides an additional benefit to a low-dust diet in the management of horses with chronic lower airway inflammatory disease. *J Vet Intern Med* **29**, 299-306.

[38] Kirschvink, N., Fievez, L., Bougnet, V., Art, T., Degand, G., Smith, N., Marlin, D., Roberts, C., Harris, P. and Lekeux, P. (2002) Effect of nutritional antioxidant supplementation on systemic and pulmonary antioxidant status, airway inflammation and lung function in heaves-affected horses. *Equine Vet J* **34**, 705-712.

[39] Giguere, S., Viel, L., Lee, E., MacKay, R.J., Hernandez, J. and Franchini, M. (2002) Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate. *Vet Immunol Immunopathol* **85**, 147-158.

[40] Picandet, V., Leguillette, R. and Lavoie, J.P. (2003) Comparison of efficacy and tolerability of isoflupredone and dexamethasone in the treatment of horses affected with recurrent airway obstruction ('heaves'). *Equine Vet J* **35**, 419-424.

[41] Leclere, M., Lefebvre-Lavoie, J., Beauchamp, G. and Lavoie, J.P. (2010) Efficacy of oral prednisolone and dexamethasone in horses with recurrent airway obstruction in the presence of continuous antigen exposure. *Equine Vet J* **42**, 316-321.

[42] Robinson, N.E., Jackson, C., Jefcoat, A., Berney, C., Peroni, D. and Derksen, F.J. (2002) Efficacy of three corticosteroids for the treatment of heaves. *Equine Vet J* **34**, 17-22.

[43] Lapointe, J.M., Lavoie, J.P. and Vrins, A.A. (1993) Effects of triamcinolone acetonide on pulmonary function and bronchoalveolar lavage cytologic features in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Vet Res* **54**, 1310-1316.

[44] Harkins, J.D., Carney, J.M. and Tobin, T. (1993) Clinical use and characteristics of the corticosteroids. *Vet Clin North Am Equine Pract* **9**, 543-562.

[45] Lepage, O.M., Laverty, S., Marcoux, M. and Dumas, G. (1993) Serum osteocalcin concentration in horses treated with triamcinolone acetonide. *Am J Vet Res* **54**, 1209-1212.

[46] Mair, T.S. (1996) Bacterial pneumonia associated with corticosteroid therapy in three horses. *Vet Rec* **138**, 205-207.

[47] Edington, N., Bridges, C.G. and Huckle, A. (1985) Experimental reactivation of equid herpesvirus 1 (EHV 1) following the administration of corticosteroids. *Equine Vet J* **17**, 369-372.

[48] McCluskey, M.J., Kavenagh, P. B. (2004) Clinical use of triamcinolone acetonide in the horse (205 cases) and the incidence of glucocorticoid-induced laminitis associated with its use. *Equine vet. Educ.* **16**, 86-89.

[49] Ammann, V.J., Vrins, A.A. and Lavoie, J.P. (1998) Effects of inhaled beclomethasone dipropionate on respiratory function in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Equine Vet J* **30**, 152-157.

[50] Couetil, L.L., Art, T., de Moffarts, B., Becker, M., Melotte, D., Jaspar, F., Bureau, F. and Lekeux, P. (2006) Effect of beclomethasone dipropionate and dexamethasone isonicotinate on lung function, bronchoalveolar lavage fluid cytology, and transcription factor expression in airways of horses with recurrent airway obstruction. *J Vet Intern Med* **20**, 399-406.

[51] Rush, B.R., Raub, E.S., Rhoads, W.S., Flaminio, M.J., Matson, C.J., Hakala, J.E. and Gillespie, J.R. (1998) Pulmonary function in horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone, respectively. *Am J Vet Res* **59**, 1039-1043.

[52] Rush, B.R., Worster, A.A., Flaminio, M.J., Matson, C.J. and Hakala, J.E. (1998) Alteration in adrenocortical function in horses with recurrent airway obstruction after aerosol and parenteral administration of beclomethasone dipropionate and dexamethasone, respectively. *Am J Vet Res* **59**, 1044-1047.

[53] Munoz, T., Leclere, M., Jean, D. and Lavoie, J.P. (2015) Serum cortisol concentration in horses with heaves treated with fluticasone propionate over a 1 year period. *Res Vet Sci* **98**, 112-114.



[54] Broadstone, R.V., Scott, J.S., Derksen, F.J. and Robinson, N.E. (1988) Effects of atropine in ponies with recurrent airway obstruction. *J Appl Physiol* (1985) **65**, 2720-2725.

[55] Muylle, E. and Oyaert, W. (1973) Lung function tests in obstructive pulmonary disease in horses. *Equine Vet J* **5**, 37-44.

[56] de Lagarde, M., Rodrigues, N., Chevigny, M., Beauchamp, G., Albrecht, B. and Lavoie, J.P. (2014) N-butylscopolammonium bromide causes fewer side effects than atropine when assessing bronchoconstriction reversibility in horses with heaves. *Equine Vet J* **46**, 474-478.

[57] Erichsen, D.F., Aviad, A.D., Schultz, R.H. and Kennedy, T.J. (1994) Clinical efficacy and safety of clenbuterol HCl when administered to effect in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Equine Vet J* **26**, 331-336.

[58] Genetzky, R.M. and Loparco, F.V. (1985) Clinical efficacy of clenbuterol with COPD in horses. *J Equine Vet Sci* **5**, 320-323.

[59] Derksen, F.J., Olszewski, M., Robinson, N.E., Berney, C., Lloyd, J.W., Hakala, J., Matson, C. and Ruth, D. (1996) Use of a hand-held, metered-dose aerosol delivery device to administer pirbuterol acetate to horses with 'heaves'. *Equine Vet J* **28**, 306-310.

[60] Murphy, J.R., McPherson, E.A. and Dixon, P.M. (1980) Chronic obstructive pulmonary disease (COPD): effects of bronchodilator drugs on normal and affected horses. *Equine Vet J* **12**, 10-14.

[61] Norton, J.L., Jackson, K., Chen, J.W., Boston, R. and Nolen-Walston, R.D. (2013) Effect of clenbuterol on tracheal mucociliary transport in horses undergoing simulated long-distance transportation. *J Vet Intern Med* **27**, 1523-1527.

[62] Rush, B.R. and Davis, E.G. (2007) Pharmacology and therapeutics of pulmonary medications. In: *Equine respiratory medicine and surgery*, Eds: B.C. McGorum, P.M. Dixon, N.E. Robinson and J. Schumacher. pp 83-99.

[63] Ducharme, N.G. and Fubini, S.L. (1983) Gastrointestinal complications associated with the use of atropine in horses. *J Am Vet Med Assoc* **182**, 229-231.

[64] Dacre, K.J., McGorum, B.C., Marlin, D.J., Bartner, L.R., Brown, J.K., Shaw, D.J., Robinson, N.E., Deaton, C. and Pemberton, A.D. (2007) Organic dust exposure increases mast cell tryptase in bronchoalveolar lavage fluid and airway epithelium of heaves horses. *Clin Exp Allergy* **37**, 1809-1818.

[65] Riihimäki, M., Raine, A., Elfman, L. and Pringle, J. (2008) Markers of respiratory inflammation in horses in relation to seasonal changes in air quality in a conventional racing stable. *Can J Vet Res* **72**, 432-439.

[66] Tremblay, G.M., Ferland, C., Lapointe, J.M., Vrins, A., Lavoie, J.P. and Cormier, Y. (1993) Effect of stabling on bronchoalveolar cells obtained from normal and COPD horses. *Equine Vet J* **25**, 194-197.

[67] Holcombe, S.J., Jackson, C., Gerber, V., Jefcoat, A., Berney, C., Eberhardt, S. and Robinson, N.E. (2001) Stabling is associated with airway inflammation in young Arabian horses. *Equine Vet J* **33**, 244-249.

[68] McGorum, B.C., Dixon, P.M. and Halliwell, R.E. (1993) Responses of horses affected with chronic obstructive pulmonary disease to inhalation challenges with mould antigens. *Equine Vet J* **25**, 261-267.

[69] Bullone, M., Helie, P., Joubert, P. and Lavoie, J.P. (2016) Development of a Semiquantitative Histological Score for the Diagnosis of Heaves Using Endobronchial Biopsy Specimens in Horses. *J Vet Intern Med* **30**, 1739-1746.

[70] Bullone, M., Joubert, P., Gagne, A., Lavoie, J.P. and Helie, P. (2018) Bronchoalveolar lavage fluid neutrophilia is associated with the severity of pulmonary lesions during equine asthma exacerbations. *Equine Vet J* **50**, 609-615.

[71] Kaup, F.J., Drommer, W. and Deegen, E. (1990) Ultrastructural findings in horses with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). I: Alterations of the larger conducting airways. *Equine Vet J* **22**, 343-348.

[72] Dubuc, J. and Lavoie, J.P. (2014) Airway wall eosinophilia is not a feature of equine heaves. *Vet J* **202**, 387-389.

[73] Hare, J.E. and Viel, L. (1998) Pulmonary eosinophilia associated with increased airway responsiveness in young racing horses. *J Vet Intern Med* **12**, 163-170.

[74] Hoffman, A.M., Mazan, M.R. and Ellenberg, S. (1998) Association between bronchoalveolar lavage cytologic features and airway reactivity in horses with a history of exercise intolerance. *Am J Vet Res* **59**, 176-181.

[75] Bedenice, D., Mazan, M.R. and Hoffman, A.M. (2008) Association between cough and cytology of bronchoalveolar lavage fluid and pulmonary function in horses diagnosed with inflammatory airway disease. *J Vet Intern Med* **22**, 1022-1028.

[76] Viel, L. (1980) Structural-functional correlations of the lung in horses with small airway disease. *M.Sc., Thesis, University of Guelph, Guelph ON, Canada.*

[77] Bullone, M., Beauchamp, G., Godbout, M., Martin, J.G. and Lavoie, J.P. (2015) Endobronchial Ultrasound Reliably Quantifies Airway Smooth Muscle Remodeling in an Equine Asthma Model. *PLoS One* **10**, e0136284.

[78] Bullone, M., Chevigny, M., Allano, M., Martin, J.G. and Lavoie, J.P. (2014) Technical and physiological determinants of airway smooth muscle mass in endobronchial biopsy samples of asthmatic horses. *J Appl Physiol* **117**, 806-815.

[79] Leclere, M., Lavoie-Lamoureux, A., Gelinas-Lymburner, E., David, F., Martin, J.G. and Lavoie, J.P. (2011) Effect of antigenic exposure on airway smooth muscle remodeling in an equine model of chronic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* **45**, 181-187.

[80] Range, F., Mundhenk, L. and Gruber, A.D. (2007) A soluble secreted glycoprotein (eCLCA1) is overexpressed due to goblet cell hyperplasia and metaplasia in horses with recurrent airway obstruction. *Vet Pathol* **44**, 901-911.

[81] Herteman, N., Bullone, M. and Lavoie, J.P. (2016) Endoscopic Evaluation of Angiogenesis in the Large Airways of Horses with Heaves Using Narrow Band Imaging. *J Vet Intern Med* **30**, 671-674.

[82] Bullone, M. and Lavoie, J.P. (2017) Science-in-brief: Equine asthma diagnosis: Beyond bronchoalveolar lavage cytology. *Equine Vet J* **49**, 263-265.

[83] Herszberg, B., Ramos-Barbon, D., Tamaoka, M., Martin, J.G. and Lavoie, J.P. (2006) Heaves, an asthma-like equine disease, involves airway smooth muscle remodeling. *J Allergy Clin Immunol* **118**, 382-388.

[84] Setlakwe, E.L., Lemos, K.R., Lavoie-Lamoureux, A., Duguay, J.D. and Lavoie, J.P. (2014) Airway collagen and elastic fiber content correlates with lung function in equine heaves. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **307**, L252-260.

[85] Chevigny, M., Guerin-Montpetit, K., Vargas, A., Lefebvre-Lavoie, J. and Lavoie, J.P. (2015) Contribution of SRF, Elk-1, and myocardin to airway smooth muscle remodeling in heaves, an asthma-like disease of horses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **309**, L37-45.

[86] Lambert, R.K., Wiggs, B.R., Kuwano, K., Hogg, J.C. and Pare, P.D. (1993) Functional significance of increased airway smooth muscle in asthma and COPD. *J Appl Physiol* (1985) **74**, 2771-2781.

[87] Robinson, N.E. (2001) International Workshop on Equine Chronic Airway Disease. Michigan State University 16-18 June 2000. *Equine Vet J* **33**, 5-19.

[88] McGorum, B.C., Dixon, P.M., Halliwell, R.E. and Irving, P. (1993) Comparison of cellular and molecular components of bronchoalveolar lavage fluid harvested from different segments of the equine lung. *Res Vet Sci* **55**, 57-59.

[89] Couetil, L.L., Rosenthal, F.S., DeNicola, D.B. and Chilcoat, C.D. (2001) Clinical signs, evaluation of bronchoalveolar lavage fluid, and assessment of pulmonary function in horses with inflammatory respiratory disease. *Am J Vet Res* **62**, 538-546.

[90] Derksen, F.J., Brown, C.M., Sonea, I., Darien, B.J. and Robinson, N.E. (1989) Comparison of transtracheal aspirate and bronchoalveolar lavage cytology in 50 horses with chronic lung disease. *Equine Vet J* **21**, 23-26.

[91] Fraipont, A., Van Erck, E., Ramery, E., Richard, E., Denoix, J.M., Lekeux, P. and Art, T. (2011) Subclinical diseases underlying poor performance in endurance horses: diagnostic methods and predictive tests. *Vet Rec* **169**, 154.

[92] Malikides, N., Hughes, K.J., Hodgson, D.R. and Hodgson, J.L. (2003) Comparison of tracheal aspirates and bronchoalveolar lavage in racehorses. 2. Evaluation of the diagnostic significance of neutrophil percentage. *Aust Vet J* **81**, 685-687.

[93] Lugo, J. and Peroni, J.F. (2007) Thoracoscopy and Lung Biopsy. In: *Equine Respiratory Medicine and Surgery*, Eds: B.C. McGorum, P.M. Dixon, N.E. Robinson and J. Schumacher. pp 271-276.

[94] Boivin, R., Vargas, A., Lefebvre-Lavoie, J., Lauzon, A.M. and Lavoie, J.P. (2014) Inhaled corticosteroids modulate the (+)insert smooth muscle myosin heavy chain in the equine asthmatic airways. *Thorax* **69**, 1113-1119.

[95] Maxwell, V., Crisman, M., Murray, M., Ley, W., Saunders, G. and Walton, A. (1996) Transendoscopic biopsy of the horse's airway mucosa. *J Equine Vet Sci* **16**, 375-379.

[96] Raphel, C.F. and Gunson, D.E. (1981) Percutaneous lung biopsy in the horse. *Cornell Vet* **71**, 439-448.

[97] Savage, C.J., Traub-Dargatz, J.L. and Mumford, E.L. (1998) Survey of the large animal diplomates of the American College of Veterinary Internal Medicine regarding percutaneous lung biopsy in the horse. *J Vet Intern Med* **12**, 456-464.

[98] Venner, M., Schmidbauer, S., Drommer, W. and Deegen, E. (2006) Percutaneous lung biopsy in the horse: comparison of two instruments and repeated biopsy in horses with induced acute interstitial pneumopathy. *J Vet Intern Med* **20**, 968-973.

[99] Russell, H.J. (1972) A modification of Movat's pentachrome stain. *Arch Pathol* **94**, 187-191.

[100] Gundersen, H.J., Bendtsen, T.F., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J.R., Pakkenberg, B., Sorensen, F.B., Vesterby, A. and et al. (1988) Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* **96**, 379-394.

[101] Votion, D.M., Vandenput, S.N., Duvivier, D.H., Lambert, P., van Erck, E., Art, T. and Lekeux, P.M. (1999) Alveolar clearance in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Vet Res* **60**, 495-500.

[102] Jean, D., Vrins, A. and Lavoie, J.P. (1999) Monthly, daily, and circadian variations of measurements of pulmonary mechanics in horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Vet Res* **60**, 1341-1346.

[103] Viel, L. (1997) Small airway disease as a vanguard for chronic obstructive pulmonary disease. *Vet Clin North Am Equine Pract* **13**, 549-560.

[104] Klein, C., Smith, H.J. and Reinhold, P. (2006) The use of impulse oscillometry for separate analysis of inspiratory and expiratory impedance parameters in horses: effects of sedation with xylazine. *Res Vet Sci* **80**, 201-208.

[105] Van Erck, E., Votion, D., Art, T. and Lekeux, P. (2004) Measurement of respiratory function by impulse oscillometry in horses. *Equine Vet J* **36**, 21-28.

[106] Brashier, B. and Salvi, S. (2015) Measuring lung function using sound waves: role of the forced oscillation technique and impulse oscillometry system. *Breathe (Sheff)* **11**, 57-65.

[107] Richard, E.A., Fortier, G.D., Denoix, J.M., Art, T., Lekeux, P.M. and Van Erck, E. (2009) Influence of subclinical inflammatory airway disease on equine respiratory function evaluated by impulse oscillometry. *Equine Vet J* **41**, 384-389.

[108] Couetil, L.L., Rosenthal, F.S. and Simpson, C.M. (2000) Forced expiration: a test for airflow obstruction in horses. *J Appl Physiol* **88**, 1870-1879.

[109] Klein, H.J. and Deegen, E. (1986) Histamine inhalation provocation test: method to identify nonspecific airway reactivity in equids. *Am J Vet Res* **47**, 1796-1800.

[110] Doucet, M.Y., Vrins, A.A. and Ford-Hutchinson, A.W. (1991) Histamine inhalation challenge in normal horses and in horses with small airway disease. *Can J Vet Res* **55**, 285-293.



[111] Gerber, V., Straub, R., Marti, E., Hauptman, J., Herholz, C., King, M., Imhof, A., Tahon, L. and Robinson, N.E. (2004) Endoscopic scoring of mucus quantity and quality: observer and horse variance and relationship to inflammation, mucus viscoelasticity and volume. *Equine Vet J* **36**, 576-582.

[112] Sherratt, M.J. (2009) Tissue elasticity and the ageing elastic fibre. *Age (Dordr)* **31**, 305-325.

[113] Ranga, V., Kleinerman, J., Ip, M.P. and Sorensen, J. (1979) Age-related changes in elastic fibers and elastin of lung. *Am Rev Respir Dis* **119**, 369-376.

[114] Soja, J., Grzanka, P., Sladek, K., Okon, K., Cmiel, A., Mikos, M., Mikrut, S., Pulka, G., Gross-Sondej, I., Nizankowska-Mogilnicka, E. and Szczeklik, A. (2009) The use of endobronchial ultrasonography in assessment of bronchial wall remodeling in patients with asthma. *Chest* **136**, 797-804.

[115] Hoshino, M., Nakamura, Y., Sim, J.J., Yamashiro, Y., Uchida, K., Hosaka, K. and Isogai, S. (1998) Inhaled corticosteroid reduced lamina reticularis of the basement membrane by modulation of insulin-like growth factor (IGF)-I expression in bronchial asthma. *Clin Exp Allergy* **28**, 568-577.

[116] Ward, C., Pais, M., Bish, R., Reid, D., Feltis, B., Johns, D. and Walters, E.H. (2002) Airway inflammation, basement membrane thickening and bronchial hyperresponsiveness in asthma. *Thorax* **57**, 309-316.

[117] Vachon, A.M. and Fischer, A.T. (1998) Thoracoscopy in the horse: diagnostic and therapeutic indications in 28 cases. *Equine Vet J* **30**, 467-475.

## **Annexes**

### **1. Évaluation des résultats statistiques associés au retrait des 2 chevaux contrôles présentant une inflammation mastocytaire > 2 % :**

Les analyses statistiques ont été effectuées lors du retrait des deux chevaux contrôles présentant une inflammation mastocytaire supérieure à 2 %. Le groupe contrôle se compose maintenant de huit chevaux. Les variations importantes des valeurs de p, modifiant la significativité des tests, associées au retrait de ces deux chevaux sont décrites ci-après. La distance entre la membrane basale et le muscle lisse est augmentée maintenant de manière significative ( $p = 0,03$ , test unilatéral) chez les chevaux asthmatiques par rapport aux chevaux contrôles. La fraction de fibres élastiques dans la matrice extracellulaire tend à corrélérer négativement avec l'âge chez les chevaux contrôles ( $r = -0,68$  ;  $p = 0,07$ ). L'aire de l'épithélium corrigée par la longueur de la membrane basale tend toujours à être augmentée chez les chevaux asthmatiques par rapport aux chevaux contrôles, cependant, la différence est moins importante ( $p = 0,12$ ). Cette différence peut être expliquée par un nombre insuffisant de chevaux dans ce groupe ou par la disparité des valeurs associée aux deux sous-populations de chevaux asthmatiques qui présentent ou ne présentent pas d'hyperplasie épithéliale. La fraction de matrice extracellulaire dans le muscle lisse tend à être augmentée chez les chevaux asthmatiques par rapport aux chevaux contrôles ( $p = 0,08$ ). Le score d'hyperplasie épithéliale est augmenté chez les chevaux asthmatiques par rapport aux chevaux contrôles, cependant la différence n'est plus significative ( $p = 0,07$ ). Finalement, la fraction de matrice extracellulaire dans le muscle lisse chez les chevaux asthmatiques qui présentent une hyperplasie épithéliale (1/1) est dès lors augmentée de manière significative par rapport aux chevaux contrôles (quel que soit leur score d'hyperplasie épithéliale) ( $p = 0,03$ ).

D'une manière générale, les valeurs de p sont modifiées légèrement. Les valeurs de p des différences hautement significatives ou non significatives sont stables. Cependant, les valeurs de p proches de la valeur seuil 0,05 diminuent ou augmentent de manière à gagner ou à

perdre cette significativité secondairement au retrait des 2 chevaux contrôles. Étant donné les faibles modifications des valeurs des tests, l'inflammation mastocytaire de ces deux chevaux n'influence pas les conclusions des tests, et peuvent être conservés, comme précédemment décrit dans les résultats.

De plus, les valeurs de p au-dessus du seuil 0,05 peuvent être expliquées par un échantillon de taille insuffisante. En effet, la majorité des tests de puissance effectués permettant d'établir le nombre de chevaux par groupe, lorsque la valeur de p était supérieure mais proche de 0,05 oscillait autour de 20 sujets, soit une taille d'échantillon raisonnable pour mettre en évidence une différence significative.

<b>Critères évalués</b>	<b>Mastocytes <math>\leq 3</math> % Test de t / Pearson Valeur de p / r ; p</b>	<b>Mastocytes <math>&lt; 2\%</math> Test de t / Pearson Valeur de p / r ; p</b>	<b>Direction de l'effet / Statut</b>
Fraction fibres élastiques dans matrice extracellulaire / âge	- 0,67 ; 0,03 *	-0,68 ; 0,04 *	Asthme
Score Hyperplasie épithéliale	0,03 *	0,07 $\Delta$	Asthme > Contrôle
Distance membrane basale – muscle lisse	0,06 $\Delta$ $\Psi$	0,03 * $\Psi$	Asthme > Contrôle
Fraction matrice extracellulaire dans muscle lisse / score hyperplasie épithéliale	0,06 $\Delta$	0,03 *	Asthme 1 > Contrôle
Aire épithélium corrigée par membrane basale	0,06 $\Delta$	0,1 $\Delta$	Asthme > Contrôle
Fraction matrice extracellulaire dans muscle lisse	0,2	0,08 $\Delta$	Asthme > Contrôle

Tableau V. Tableau récapitulatif de l'effet du retrait des deux chevaux asthmatiques avec une inflammation mastocytaire pulmonaire  $> 2$  %. Asthme 1, chevaux asthmatiques avec un score d'hyperplasie épithéliale 1/1. \* différence significative ( $p < 0,05$ ) ;  $\Delta$  tendance à une différence significative ( $p \leq 0,1$ ) ;  $\Psi$  test de t unilatéral.

## 2. Coloration MOVAT

### 2.1. Protocole de préparation des colorants pour coloration MOVAT (Selma Ben Hamouda)

- **Solution Bleu Alcian 1 % (pour 100 ml) => Pour solution de 300 ml**

- Bleu alcian (1 g) => 3g
- Eau distillée (100 ml) => 300 ml
- Acide acétique glacial (2 ml) => 6ml

*Mélanger la solution et la filtrer. Conserver à la température de la pièce.*

- **Alcool alcalin (pour 100ml) => Pour solution de 300ml**

- Hydroxyde d'ammonium (10 ml) => 30 ml
- Alcool 95 % (90 ml) => 270 ml

- **Solution iode-iodure (pour 100 ml) => Pour solution de 200 ml**

- Iode (2 g) => 4g
- Iodure de potassium (2 g) => 4g
- Eau distillée (100 ml) => 200 ml

*Ajouter l'iode et l'iodure de potassium à 25 ml/100 ml et mélanger jusqu'à dissolution. Ajouter le reste de l'eau ensuite.*

*L'iodure de potassium ne se dissout pas complètement*

- **Hématoxyline alcoolique 10 % (pour 100 ml) => Pour solution de 200ml**

- Hématoxyline (10 g) => 20g
- Alcool (grade histologique) (100 ml) => 200 ml

*Mélanger 15 min. et filtrer. L'hématoxyline ne sera pas complètement dissoute, un résidu sablonneux persiste. Aussi, elle met du temps à filtrer.*

- **Chlorure ferrique 10 % (pour 100ml) => Pour solution de 200ml**
  - Chlorure ferrique (10 g) => 20g
  - Eau distillée (100 ml) => 200 ml

*Bien mélanger à la pipette et insister sur le fond du bécher car le chlorure ferrique a tendance à s'accoler et se solidifier au fond de celui-ci.*
- **Thiosulfate de sodium 5 % (pour 100 ml) => Pour une solution de 300 ml**
  - Thiosulfate de sodium (5 g) => 15g
  - Eau distillée (100 ml) => 300 ml
- **Safran alcoolique (pour 100 ml) => Pour solution de 300 ml**
  - Safran du Gatinais (6 g) => 18g
  - Alcool (grade histologique) (100 ml) => 300 ml

*J'utilise une solution de Safran du Gatinais commerciale, déjà diluée.*  
*À garder scellée en tout temps.*
- **Solutions pour le mélange crocéine scarlet– fuchsine acide**
  - **Solution A (pour 100 ml) => Pour solution de 300 ml**
    - Crocéine scarlet (1 g) => 3g
    - Eau distillée (99,5 ml) => 298.5 ml
    - Acide acétique glacial (0,5 ml) => 1,5 ml
  - **Solution B (pour 100 ml) => Pour une solution de 100 ml**
    - Fuchsine acide (1 g) => 1g
    - Eau distillée (99,5 ml) => 99,5 ml
    - Acide acétique glacial (0,5 ml) => 0,5 ml
- **Solution d'acide phosphotungstique 5 % (pour 100 ml) => Pour une solution de 600 ml**
  - Acide phosphotungstique (5 g) => 30g (ou 30ml si solution)

- Eau distillée (100 ml) => 600 ml

*J'ai utilisé une solution d'acide phosphotungstique à 10 % que j'ai dilué 1 : 2 dans de l'eau distillée (200 ml d'acide dans 400 ml d'eau distillée).*

**Solutions à préparer pendant l'expérience (ou avant) :**

- **Solution d'hématoxyline => 200 ml**

- Hématoxyline alcoolique 10 % => 50 ml
- Alcool (grade histologique) => 50 ml
- Chlorure ferrique 10 % => 50 ml
- Solution iode-iodure => 50 ml

*Mélanger avec un ratio 1 : 1 : 1 : 1*

- **Solution de chlorure ferrique 2 % => 250 ml**

- Chlorure ferrique 10 % => 50 ml
- Eau distillée => 200 ml

*Mélanger avec un ratio 1 : 4*

- **Solution crocéine scarlet – fuchsine acide => 300 ml**

- Solution A => 150 ml
- Solution B => 37,5 ml

*Mélanger avec un ratio 4 : 1 (Solution A : Solution B)*

- **Solution d'acide acétique 0,5 % (pour 100 ml) => Pour une solution de 1L**

- Acide acétique glacial (0,5 ml) => 5 ml
- Eau distillée (99,5 ml) => 995 ml

## **2.2. Protocole de coloration MOVAT (Selma Ben Hamouda)**

### **I. Déparaffinage et réhydratation des lames :**

1. Xylène (pas en contact avec eau) : 10 minutes
2. Alcool 100 % : 2 minutes
3. Alcool 95 % : 2 minutes
4. Alcool 80 % : 2 minutes
5. Eau courante : 2 minutes

### **II. Coloration**

1. Tremper les lames dans la solution de bleu alcian 1 % pendant 20 min.
2. Laver à l'eau courante pendant 5 min.
3. Tremper les lames dans l'alcool alcalin pendant 1 heure.
4. Laver à l'eau courante pendant 10 min.
5. Rincer à l'eau distillée.
6. Tremper les lames dans la solution d'hématoxyline pendant 15 min. Ce temps peut être réduit à 10 minutes pour les tissus parenchymateux ou si les lames ou les tissus ne sont pas frais.
7. Rincer dans plusieurs bains (3) d'eau distillée.
8. Tremper les lames dans la solution de chlorure ferrique 2 % jusqu'à ce que les fibres élastiques aient un bon contraste (environ 50 secondes).
9. Rincer à l'eau distillée.
10. Tremper les lames dans la solution de thiosulfate de sodium 5 % pendant 1 min.
11. Laver à l'eau courante pendant 5 min.
12. Rincer à l'eau distillée.
13. Tremper les lames dans la solution de crocéine scarlet – fuchsine acide pendant 5 min.
14. Rincer dans plusieurs bains (5) d'eau distillée.
15. Rincer dans l'acide acétique 0, 5%.



16. Tremper les lames dans 2 bains d'acide phosphotungstique 5 %, 5 min. par bain.  
L'acide phosphotungstique permet la décoloration du collagène et de la réticuline.
17. Rincer dans l'acide acétique 0,5 %.
18. Rincer dans 3 bains d'alcool (grade histologique).
19. Tremper dans la solution de Safran du Gatinais pendant 5 min (15 minutes s'il s'agit d'un tissu vieux ou parenchymateux ou d'une vieille lame).
20. Rincer dans 3 bains d'alcool (grade histologique).
21. Laver dans 3 bains de xylène.
22. Sécher les lames du xylène sous l'hôte.
23. Fixer des lamelles sur les lames avec une résine synthétique.